



UNIVERSIDAD DE ORIENTE  
NÚCLEO DE SUCRE  
ESCUELA DE CIENCIAS  
POSTGRADO DE BIOLOGIA APLICADA

ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE *Burkholderia cepacia* AISLADA DE MAÍZ  
AMARILLO (*Zea mays* L.) BAJO DIFERENTES CONDICIONES  
DE CULTIVO

(Modalidad: Investigación)

EVIS PARRA GONZÁLEZ

TRABAJO DE GRADO PRESENTADO COMO REQUISITO PARCIAL PARA  
OPTAR AL TÍTULO DE MAGISTER SCIENTIARUM EN BIOLOGIA  
APLICADA MENCIÓN: MICROBIOLOGÍA APLICADA

CUMANÁ, 2009

ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE *Burkholderia cepacia* AISLADA DE MAÍZ  
AMARILLO (*Zea mays* L.) BAJO DIFERENTES CONDICIONES  
DE CULTIVO

## ÍNDICE GENERAL

DEDICATORIA -----	i
AGRADECIMIENTO -----	ii
LISTA DE TABLAS -----	iii
LISTA DE FIGURAS -----	iv
RESUMEN -----	vi
INTRODUCCIÓN -----	1
MATERIALES Y MÉTODOS -----	15
1.1. Muestreo -----	15
1.2. Aislamiento de las colonias bacterianas -----	17
1.2. Caracterización morfológica de las colonias -----	18
1.4. Caracterización bioquímica e Identificación de <i>Burkholderia cepacia</i> -----	18
1.5. Cepas y Condiciones de Cultivo -----	18
1.6. Subcultivo de las Cepas Bacterianas -----	19
1.7. Determinación de la Actividad Antifúngica -----	19
1.8. Efecto Antagónico de <i>B. cepacia</i> . -----	19
1.8.1. Método Directo -----	20
1.8.2. Método Indirecto -----	20
1.8.3. Lectura de los halos de Inhibición. -----	20
1.9. Determinación del Efecto de las condiciones de Cultivo en la Actividad Antifúngica -----	21
1.9.1. Influencia de la fuente de carbono sobre la actividad antifungica de <i>B. cepacia</i> -----	21
1.9.2. Influencia de la fuente de nitrógeno sobre la actividad antifungica de <i>B. cepacia</i> -----	21
1.9.3. Efecto del pH sobre la actividad antifúngica de <i>B. cepacia</i> -----	21
1.9.4. Efecto de la temperatura sobre la actividad antifúngica de <i>B. cepacia</i> -----	22
1.10. Aislamiento y Purificación de los posibles compuestos antifúngicos. -----	22

1.10.1. Extracción de metabolitos activos de las cepas de <i>B. cepacia</i> . -----	22
1.10.2. Cálculo del Porcentaje de Inhibición: -----	23
1.11. Determinación de Compuestos antifúngicos mediante Cromatografía en Capa Fina (TLC)-----	23
RESULTADOS -----	25
DISCUSIÓN -----	44
CONCLUSIONES-----	53
RECOMENDACIONES-----	54
BIBLIOGRAFÍA -----	55
HOJA DE METADATOS-----	69

## **DEDICATORIA**

A

Dios, por haberme creado y por su amor incondicional.

Mis padres, Arnaldo e Ynelda, por darme la vida y ser mis ejemplos a seguir.

Mi Esposo Pavel, por su paciencia y apoyo siempre.

Mis preciosas hijas, Arantza, Ariadna y Anelissa, porque compartieron conmigo toda esta experiencia.

## AGRADECIMIENTO

A

La Profesora Sara Centeno, por su aceptación, excelente e incondicional apoyo, estímulo constante y por mostrarme a través de conocimientos y experiencia lo interesante y bonito que puede ser la micología.... ¡Y lo que falta profesora! ..... Gracias por su paciencia y espera.

El profesor Oscar Crescente por su valiosa colaboración para culminar con el último objetivo de mi tesis, en el Laboratorio de Productos Naturales.

El Licenciado José Astudillo por su ayuda en la realización de la Cromatografía en Capa Fina.

Mis colegas y amigas María y Brunnel quienes me dieron mucha fuerza y ánimos para seguir adelante y no rendirme en ningún momento por los obstáculos que tuve en el camino.

Todas aquellas personas que de una u otra forma contribuyeron a la culminación de este trabajo.

A todos muchas gracias.

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Géneros bacterianos asociados a rizósfera de maíz ( <i>Zea mays</i> L) y flora bacteriana total (promedios de UFC/g de rizósfera) en las cuatro plantaciones de estudio. Municipio Montes, estado Sucre. Abril-Septiembre de 2006. -----	27
<b>Tabla 2.</b> Características morfológicas y bioquímicas de las cepas de <i>Burkholderia cepacia</i> aisladas de maíz amarillo ( <i>Zea mays</i> L) en cuatro plantaciones del Municipio Montes, estado Sucre. Abril-Septiembre 2006. -----	28
<b>Tabla 3.</b> Variaciones fenotípicas de identificación bioquímica de las cepas de <i>Burkholderia cepacia</i> aisladas de Maíz amarillo ( <i>Zea mays</i> L) en cuatro plantaciones del Municipio Montes, estado Sucre. Abril-Septiembre 2006. -----	30
<b>Tabla 4.</b> Variedades fenotípicas de los aislados de <i>B. cepacia</i> en las diferentes plantaciones del Municipio Montes, estado Sucre. Abril-Septiembre 2006.-----	31
<b>Tabla 5.</b> Promedio (mm) de los halos de inhibición producidos por las cepas de <i>Burkholderia cepacia</i> frente a hongos fitopatógenos mediante enfrentamiento dual (método directo). Período de incubación 72 horas. -----	32
<b>Tabla 6.</b> Promedio (mm) de halos de inhibición producidos por las cepas de <i>Burkholderia cepacia</i> frente a hongos fitopatógenos mediante la técnica de discos de agar (método indirecto). Período de incubación 72 horas.-----	35
<b>Tabla 7.</b> Porcentaje de inhibición del crecimiento radial de <i>Trichoderma viride</i> ante diferentes diluciones de los metabolitos activos obtenidos de cada una de las cepas de <i>Burkholderia cepacia</i> aisladas de rizósfera de maíz.-----	43

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Plantación de maíz amarillo. Finca San Baltazar. Cumanacoa. -----	16
Septiembre, 2006. -----	16
<b>Figura 2.</b> Rizósfera de maíz amarillo ( <i>Zea mays</i> L.). Plantaciones del Municipio Montes. Septiembre, 2006. -----	17
<b>Figura 3.</b> Inhibición de <i>Trichoderma viride</i> producida por una cepa de <i>Burkholderia cepacia</i> por el método directo de enfrentamientos duales. -----	33
<b>Figura 4.</b> Inhibición de <i>Trichoderma viride</i> producida por una cepa de <i>Burkholderia cepacia</i> por el método indirecto. A: Disco de agar haciendo contacto con el medio de cultivo. B: Disco de agar haciendo contacto con el microorganismo. -----	34
<b>Figura 5.</b> Efecto de la temperatura sobre la actividad antifúngica de cepas de <i>Burkholderia cepacia</i> en cepas aisladas de rizósfera de maíz amarillo ( <i>Zea mays</i> L.) en diferentes plantaciones sobre <i>Trichoderma viride</i> . Municipio Montes, Estado Sucre. Abril-Septiembre de 2006.-----	37
<b>Figura 6.</b> Efecto del pH sobre la actividad antifúngica de cepas de <i>Burkholderia cepacia</i> aisladas de rizósfera de maíz amarillo ( <i>Zea mays</i> L.) en diferentes plantaciones, sobre <i>Trichoderma viride</i> . Municipio Montes, Estado Sucre. Abril-Septiembre de 2006 -----	38
<b>Figura 7.</b> Efecto de diferentes fuentes de carbono sobre la actividad antifúngica de cepas de <i>Burkholderia cepacia</i> aisladas de rizósfera de maíz amarillo ( <i>Zea mays</i> L.) en diferentes plantaciones, sobre <i>Trichoderma viride</i> . Municipio Montes, Estado Sucre. Abril-Septiembre de 2006 -----	39
<b>Figura 8.</b> Efecto de la variación de la fuente de nitrógeno sobre la actividad antifúngica de cepas de <i>Burkholderia cepacia</i> aisladas de rizósfera de maíz amarillo ( <i>Zea mays</i> L.) en diferentes plantaciones, sobre <i>Trichoderma viride</i> . Municipio Montes, Estado Sucre. Abril-Septiembre de 2006-----	40

**Figura 9.** Inhibición producida por el extracto de metabolitos activos de *Burkholderia cepacia* sobre *Trichiderma viride*. -----42

## RESUMEN

Se evaluó la actividad antifúngica in vitro de 4 cepas de *Burkholderia cepacia* aisladas de rizósfera de maíz amarillo (*Zea mays* L.) de diferentes plantaciones del Municipio Montes, estado Sucre, Venezuela, contra hongos fitopatógenos. Se comparó la actividad antagonica con una cepa control de origen ambiental CVCM 626 (ATCC 25416) y un aislado clínico CVCM 1282. La actividad antifúngica se evaluó empleando el método directo de enfrentamientos duales y un método indirecto de difusión con discos de agar. Igualmente se extrajeron los metabolitos activos y se realizó cromatografía en Sílica Gel, utilizando la mezcla hexano-acetona (3:1) como fase móvil, para tratar de aislar los compuestos. Las pruebas se elaboraron por triplicado, se midió el diámetro de los halos de inhibición formados y se aplicó análisis de varianza de una vía (ANOVA) con un nivel de confianza del 95% y la prueba Tukey. Las cuatro cepas aisladas (SR2, ER3, LG12 y N10) mostraron una actividad antifúngica similar sobre *Trichoderma viride*, y ocasionaron una inhibición total o parcial de la esporulación en hongos como *Fusarium moniliforme*, *Fusarium solani*, *Aspergillus niger* y *Penicillium expansum*. Los mayores halos de inhibición fueron producidos por la cepa CVCM 626, observándose un promedio de 9,9mm. No se evidenció ningún nivel de antagonismo utilizando el aislado clínico. Se mostró aumento de la actividad antagonica frente a *T. viride* con algunas fuentes de carbono como xilosa, maltosa, manosa y fructosa, en un rango de pH ácido (4 a 5.5), y a una temperatura de 35°C. El efecto antifúngico de las cepas aisladas sugiere la presencia de posibles metabolitos volátiles y difusibles, aunque no se demostró la actividad antifúngica de las fracciones hexano-acetona obtenidas de los extractos de las cepas bacterianas estudiadas. Además, se comprobó la versatilidad de esta bacteria para producir actividad antifúngica utilizando una variedad de fuentes de carbono, nitrógeno, pH y temperatura para su crecimiento, evidenciando su potencial para el control biológico de hongos fitopatógenos.

Palabras o Frases Claves: *Burkholderia cepacia*, fitopatógenos, control biológico.

## INTRODUCCIÓN

Cada año, los patógenos de las plantas son responsables de la pérdida de 10 a 20% de la producción agrícola a nivel mundial, a pesar de los millones de dólares que se invierten anualmente en productos químicos (fungicidas) para su control (McSpadden, 2002). Debido a la importancia comercial que tienen los cultivos, los problemas crecientes de toxicidad derivados del uso indiscriminado de plaguicidas y al alto costo de los mismos, se ha hecho indispensable el desarrollo de métodos alternativos de control, entre los cuales, el más reciente es el uso de microorganismos antagonistas, como una estrategia promisoriosa para el control de bacterias y hongos fitopatógenos (Anauratha y Gnanamanickam, 1990).

La aplicación de microorganismos rizosféricos en la agricultura es una práctica que, internacionalmente, ha tomado auge en los últimos años. El control biológico se presenta como una alternativa potencial libre de riesgo frente a los numerosos y crecientes problemas derivados del uso de los plaguicidas. Cook y Baker (1983), definen el control biológico como la reducción de la actividad productora de enfermedad de un patógeno o parásito en su estado activo, por uno o más organismos antagónicos, en forma natural o por manejo del habitante, hospedero o de los propios microorganismos.

El control biológico ofrece ventajas por su bajo costo, no contamina el ambiente, y no presenta problemas de residuos, pero los resultados disponibles han sido obtenidos mayormente *in vitro* y bajo condiciones controladas. Sin embargo, se han ido incrementando los trabajos de investigación en diferentes países del mundo. Actualmente, el control biológico se constituye en uno de los grandes retos de nuestros tiempos (FAO, 1990).

Ejemplos de control biológico se han reportado por Sivamani y Gnanamanickam (1988), quienes han empleado *Pseudomonas fluorescens* para el control de la enfermedad del “mal de panama” en platanos (*Musa* spp.), causada por *Fusarium oxysporum* en el sur de la India. En otro caso, reportado por Anuratha y Gnanamanickam (1990), se utilizaron cepas de *Bacillus* spp. y *P. fluorescens* como control biológico de pudriciones bacterianas causadas por *Rhodococcus solanacearum* en plátano (*Musa* spp.), berenjena (*Solanum melongena*) y tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) en la India y en la región del Pacífico sur.

*Burkholderia* es uno de los géneros bacterianos utilizados para biorremediación de herbicidas y pesticidas recalcitrantes, como agentes de control biológico de hongos fitopatógenos así como por su habilidad de promover el crecimiento de cultivos (Saiman y Siegel, 2004).

*B. cepacia*, anteriormente llamada *Pseudomonas cepacia* (Gregory 1986), es una bacteria Gram negativa, nutricionalmente muy versátil, descrita como un fitopatógeno responsable de la pudrición bacteriana de la cebolla (*Allium cepa* L.) por Walter Burkholder en el año 1949 (Gilligan, 1991; Speert *et al.*, 1994; Govan y Deretic, 1996; Govan *et al.*, 2000; Lipuma *et al.*, 2002).

Taxonómicamente *B. cepacia* comprende, en la actualidad, nueve especies distintas o genomovars, denominadas colectivamente como “complejo *Burkholderia cepacia*”, que incluye los genotipos: *B. cepacia* (Genomovar I), *Burkholderia multivorans* (genomovar II), *Burkholderia cenocepacia* (genomovar III), *Burkholderia vietnamienses* (genomovar V), *Burkholderia dolosa* (genomovar VI), *Burkholderia ambifaria* (genomovar VII), *Burkholderia anthina* (genomovar VIII) y *Burkholderia pyrrocinia* (genomovar IX) (Vandamme *et al.*, 1997, 2000, 2002, 2003; Coenye *et al.*, 2001; Vermis *et al.*, 2002).

Desde el año 2004, no se han incluido, formalmente, más descripciones de especies bacterianas dentro del complejo *B. cepacia*; sin embargo, mediante análisis de secuencia del gen *recA* se demostró la existencia de cuatro nuevos fenotipos designados como *B. cepacia* grupo K, *B. cepacia* grupo AW, BCC1 y BCC2 (Payne *et al.*, 2005). Posteriormente, mediante **tipificación por secuencia de multilocus** (MLST) se han designado siete grupos distintos que aún no han sido incluidos formalmente en el complejo *B. cepacia*, designados como: *B. cepacia* grupo K, BCC1, BCC2, BCC3, BCC4, BCC5 y BCC6 (Baldwin *et al.*, 2005, 2007; Mahenthiralingam *et al.*, 2005; Dalmastri *et al.*, 2007).

La diferenciación de las especies del complejo *B. cepacia* sólo mediante pruebas bioquímicas convencionales no es sencilla, sólo las especies *B. multivorans* y *B. stabilis* se pueden distinguir del resto del complejo utilizando simples pruebas (Henry *et al.*, 2001). La falla en la identificación de la bacteria sigue siendo un problema que confrontan muchos laboratorios de diagnóstico microbiológico. Se han descrito los mejores métodos para la identificación fenotípica, y en todos se recomienda incluir medios selectivos como agar *B. cepacia* (BCSA) para aislamientos clínicos y medios poco selectivos como el medio policíclico hidrocarbonado “*P. cepacia*” (PCAT) y Trypan-Blue-Tetraciline (TB-T) para aislados ambientales (Coenye *et al.*, 2001; Ramette *et al.*, 2005). Igualmente, el medio Stewart`s es una gran ayuda para el aislamiento e identificación de bacterias del complejo *B. cepacia*. Diversos kits comerciales, de pruebas bioquímicas, fallan en la identificación exacta de la bacteria, pero si estos se combinan con un crecimiento positivo en agar BCSA y pruebas específicas como descarboxilación de lisina y ornitina, oxidación de sacarosa y adonitol, positividad a la oxidasa, hemólisis y crecimiento a 42°C, generalmente se puede llegar a una correcta identificación fenotípica de la bacteria. La forma más precisa y exacta de confirmar la identificación fenotípica de las bacterias del complejo *B. cepacia* es utilizando métodos genéticos.

Todas las especies bacterianas pertenecientes al complejo *B. cepacia* pueden ser identificadas mediante la comparación de secuencias del gen 16S rRNA. La técnica de FISH o hibridación fluorescente *in situ* basada en el gen 16S rRNA ha sido prometedora para la identificación microscópica directa de la bacteria en frotis de esputo (Coenye y Vandamme, 2003; Brown y Govan, 2007). La secuencia parcial del gen 16S rRNA o el análisis de polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) de este gen no es lo suficientemente discriminatorio para todas las especies si el gen es más del 98% idéntico para los miembros del complejo. El análisis de polimorfismos en la secuencia del gen que codifica para la proteína, *recA*, ha demostrado ser más confiable para designar y contribuir al formal nombramiento de muchas especies. (Mahenthiralingam *et al.*, 2000).

Igualmente, el análisis del gen *recA* permitió subdividir a *B. cenocepacia* en cuatro subgrupos referidos como *B. cenocepacia* IIIA, IIIB, IIIC y IIID (Vandamme *et al.*, 2003). Sin embargo, ahora un nuevo método de tipificación por secuencia de multilocus (MLST) ha demostrado muy buenos resultados. El MLST es una técnica de Biología Molecular para el tipeo de muchos locus. Este caracteriza aislamientos de especies usando secuencias de ADN de fragmentos internos de muchos genes housekeeping (usualmente 7) que en el esquema del complejo *B. cepacia* se localizan en el primero y segundo cromosoma (ATP sintetasa B-cadena, *atpD*, glutamato sintetasa subunidad larga, *gltB*; ADN girasa B, *gyrB*; recombinasa A, *recA*; proteína de unión GTP, *lepA*; acetoacetyl-Coa reductasa, *phaC* y triptófano sintetasa, *trpB*), de aprox. 450-500 pb, los amplifica y luego se secuencian mediante un secuenciador automático, caracterizando así cadenas por su perfil electroforético (Baldwin *et al.*, 2005).

Otros genes como el *opcL*, que codifica para el peptidoglicano asociado a la membrana externa lipoproteica de las bacterias del complejo *B. cepacia*, también ha sido muy útil en la identificación de especies (Plesa *et al.*, 2004); sin embargo, la

secuencia de datos usada para este marcador por la comunidad científica ha sido limitada.

En cuanto a la caracterización de las cepas ambientales, esta ha sido más limitada que la investigación de la epidemiología clínica del complejo. La descripción original de *Pseudomonas cepacia* y muchos de los estudios iniciales de este grupo de bacterias fueron enfocados en su microbiología ambiental. Las plantas del grupo de las Gramíneas parecen ser los huéspedes rizosféricos más importantes del complejo *B. cepacia*. La clasificación de especies asociadas con ciertas especies de plantas demuestran que muchas bacterias pertenecientes al complejo *B. cepacia* están asociadas con pasto y maíz (Parke y Gurian, 2001).

La rizósfera es ahora considerada como la mayor fuente de mantenimiento de endófitos (Hallmann *et al.*, 1997, 2001; Sturtz *et al.*, 2000; Compant *et al.*, 2005; Gray y Smith, 2005). Algunas bacterias rizosféricas son capaces de penetrar el tejido de la raíz, trascender la barrera endodérmica, y cruzar la corteza hacia el sistema vascular, y por consiguiente establecer poblaciones endófitas en varios órganos tanto vegetativos como reproductivos. Esto ha sido descrito en un gran número de plantas, y en varios géneros bacterianos. Es de resaltar que algunos miembros del complejo *B. cepacia* son endófitos comunes (Lodewyckx *et al.*, 2002).

*B. cepacia* (genomovar I), *B. cenocepacia* (genomovar III) y *B. ambifaria* (genomovar VII) han sido reportadas como los miembros más difundidos del complejo *B. cepacia* en la rizósfera del maíz (Fiore *et al.*, 2001; Bevivino *et al.*, 2002), sin embargo, Balandreau *et al.*, (2001) encontraron que los microorganismos del complejo *B. cepacia* frecuentemente aislados de la rizósfera de maíz y del trigo, pertenecían a *B. cenocepacia* (genomovar III). Estudios realizados por Parke y Gurian (2001), sobre la distribución ambiental de especies del complejo *B. cepacia* han sido

publicados y para ello se enfocaron en las poblaciones que interactúan con las plantas de cosecha, como una de los hábitats más importantes de esta bacteria.

Ramette *et al.* (2005), en sus estudios sobre la diversidad de especies del complejo *B. cepacia* presentes en rizósfera de plantas de maíz, en Estados Unidos, encontraron a *B. ambifaria* y *B. cepacia* (64 y 20% respectivamente) como las especies más comunes; también aislaron *B. multivorans*, *B. cenocepacia*, *B. stabilis*, *B. dolosa* y *B. pyrrocinia*, sugiriendo con esto que la rizósfera de maíz es una fuente ambiental muy rica de *B. cepacia*.

Se han encontrado especies del género *Burkholderia* produciendo enfermedades en las plantas, entre ellas, *B. cepacia* está envuelta en este tipo de interacción. Una enfermedad causada por esta especie es la pudrición de la cebolla mediante la infección de las hojas y bulbos, pero otras plantas también pueden ser infectadas entre las cuales se encuentran tipos de orquídeas (*Cymbidiumm* spp., *Dendrobium* sp., *Paphiopedilum* spp.) y el tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) (Saddler, 1994).

Algunas de las propiedades benéficas de estas especies pertenecientes al complejo *B. cepacia* han sido estudiadas para el control biológico. Como se ha descrito, *B. cepacia* puede vivir de manera libre o endófito, formando asociaciones simbióticas que promueven el crecimiento de plantas, y han sido consideradas como beneficiosas en el ambiente natural. Estas especies son bien conocidas por sus propiedades biológicas y metabólicas, que pueden ser explotadas para el control biológico de hongos fitopatógenos pero también en la biorremediación y promoción del crecimiento de las plantas (Govan *et al.*, 1996; Holmes *et al.*, 1998; Parke y Gurian, 2001; Perin *et al.*, 2006). Debido a su extraordinaria versatilidad metabólica, *B. cepacia*, es capaz de degradar sustratos aromáticos clorados (compuestos tóxicos encontrados en herbicidas y pesticidas complejos, algunos con alto potencial

carcinógeno) como el ácido 2,4,5 –triclorofenoxiacético (2,4,5-T) para usarlos como fuente de carbono (Sangodkar *et al.*, 1998).

La microbiota del suelo tiene una gran variedad de microorganismos que cumplen un rol esencial en los procesos biogeoquímicos de la materia. Entre las actividades de los microorganismos (hongos, bacterias y otros) está el mantenimiento de la fertilidad del suelo; siendo los responsables de la degradación de toda la materia orgánica muerta para formar el humus, retornando al suelo y a la atmósfera las sustancias transformadas por otros seres vivos. No obstante, los hongos que se encuentran en el suelo tienen gran importancia en otros aspectos, ya que muchos son fitopatógenos que atacan a plantas de interés económico a través de la raíz o a nivel del suelo (George, 1963).

El género *Trichoderma* está compuesto por hongos que se encuentran presentes en forma natural en casi todos los suelos y hábitats del planeta. Es un Deuteromicete perteneciente al grupo de los Hifomicetes, y se caracteriza porque se desarrolla rápidamente y emite una gran cantidad de esporas. Es un hongo que se encuentra frecuentemente sobre madera y tejidos vegetales en descomposición (Soriano, 2007). Además ha sido uno de los hongos más estudiados por su capacidad de micoparasitar a otros hongos (Howell y Stipanovic, 1995).

El micoparasitismo es un proceso complejo que incluye diversos pasos sucesivos. La interacción inicial detectable muestra que las hifas del micoparásito crecen directamente hacia el hospedero. Este fenómeno se manifiesta, como un crecimiento quimiotrópico de *Trichoderma*, para algunos estímulos en las hifas del hospedero o hacia un gradiente de excretas químicas por el hospedero (Elad *et al.*, 1983). Un hongo es considerado micoparásito cuando ataca directamente a un hospedero en un sistema biótico. Barnett y Binder (1973) dividen el micoparasitismo, de acuerdo a la utilización de nutrientes como: parasitismo necrótico (destrutivo), en

el cual la relación resulta en la muerte de uno o más componentes del hospedero, y parasitismo biotrófico (balanceado) en el cual el desarrollo del parásito es favorable para vivir antes de que muera la estructura del hospedero. Algunas veces es utilizado el término *hiperparasitismo* para describir a un hongo que es parasítico de un hongo antagonista. Como resultado, la mayoría de estos hongos, que muchas veces son empleados como agentes de control biológico en invernaderos o fincas, han sido necrotróficos (Adams, 1990; Chet, 1987; Baker, 1987). Esta actividad necrotrófica es atribuida a la producción de toxinas o enzimas hidrolíticas, en cantidades que causan la muerte o destrucción de sus hospederos, y es propia de hongos agresivos, con un rango de huéspedes muy amplio (Manocha, 1991).

*T. viride* y *T. harzianun* pertenecen al grupo de cepas de *Trichoderma* que ejercen el parasitismo de forma necrotrópica, es decir, provocan la muerte de las células del huésped, bien antes de realizar la invasión o después de la misma, y aprovechar así sus nutrientes. Se caracterizan por tener un comportamiento muy agresivo frente a un amplio rango de hongos fitopatógenos, y dada la capacidad que tienen de sobrevivir como saprófitos, pueden mantener colonizados indefinidamente una gran variedad de sustratos. (Gachomo y Kotchoni, 2008).

El género *Fusarium* tiene una amplia distribución, tanto en suelos como en sustratos orgánicos. Presenta especies fitopatógenas, que causan graves enfermedades principalmente en los cereales, aunque puede afectar a otros vegetales y frutas. Su importancia no se debe tan sólo a la pérdida de las cosechas, sino también a la elaboración de micotoxinas. Estas micotoxinas pueden estar presentes en los cereales y sus productos, produciendo síndromes de intoxicación en los animales y llegando a la cadena alimenticia de los humanos. Se considera que *Fusarium moniliforme* es la especie productora de toxinas de mayor prevalencia en las regiones templadas del hemisferio norte y se encuentra habitualmente en cereales cultivados en regiones templadas de América, Europa y Asia. Las toxinas más comunes elaboradas por

especies del género *Fusarium* moniliforme son las fumonisinas y la zearalenona, pero se han encontrado otras especies produciendo: moniliformina y los tricoticenos (toxina T, vomitoxina). *Fusarium* spp. también causan podredumbres de la raíz, corona y tallo de las plantas, y algunos son capaces también de provocar enfermedades de marchitamiento vascular sistémico (Manning y Vandaro, 1973).

Las especies de *Pecinillium* son consideradas como contaminantes habituales de diferentes sustratos y presentan la capacidad de producir diversas micotoxinas. Dentro de este género, *P. expansum* es considerada la especie productora más importante de patulina, micotoxina que se ha encontrado en una amplia variedad de alimentos, como distintos tipos de frutas (manzanas, albaricoques, melocotones, peras, uvas, entre otras) y derivados (jugos de frutas) y también en cereales y ensilados. También presenta la capacidad de elaborar citrinina, la cual se ha detectado en algunos alimentos como el arroz, maíz, trigo y cebada, fundamentalmente (Soriano, 2007).

El género *Aspergillus* comprende especies mayoritariamente ubicuas, aislándose de diferentes sustratos, aunque con mayor frecuencia de climas cálidos. Algunas especies tienen interés por su importancia industrial, otras por ser agentes de biodeterioro o producir micotoxinas (aflatoxinas, ácido ciclopiazónico, ocratoxina, citrinina, patulina, zearalenona) o por ser patógenas para los animales y los vegetales. Desde la descripción de la producción de ocratoxina A, por *Aspergillus niger*, el número de estudios sobre la capacidad ocratoxigénica de la especie ha aumentado considerablemente (Soriano, 2007).

Se han descrito cuatro mecanismos de acción de los antagonistas para controlar el desarrollo de patógenos. 1) Parasitismo directo y muerte del patógeno, 2) competencia con el patógeno por el alimento, 3) efectos tóxicos directos sobre el patógeno por medio de sustancias antibióticas liberadas por el antagonista y 4)

efectos tóxicos indirectos sobre el patógeno por sustancias volátiles como el etileno, liberadas por las actividades metabólicas del organismo antagonista. (Cook y Baker, 1983; Melgarejo *et al.*, 1989; Mondino y Vero, 1999)

La capacidad de *Burkholderia cepacia* como agente de control biológico ha sido demostrada ante hongos fitopatógenos. Se han reportado disminución de enfermedades fúngicas como: manchas en las hojas de la nuez y tabaco ocasionadas por cercosporas; el moho azul y gris de la manzana (*Malus sylvestris L.*) causada por *Botrytis cinerea* y *Penicillium expansum*, respectivamente, el damping-off causado por *Fusarium oxysporum* en plantas cebolla (*Allium cepa L.*) y reducción de daños ocasionados a la hoja del maíz por *Bipolaris maydis* (Jayaswal *et al.*, 1993; Holmes *et al.*, 1998; El-Banna *et al.*, 1998)

La producción de un compuesto antifúngico ha sido considerado como uno de los mecanismos envueltos en el antagonismo (Upadhyay *et al.*, 1991). Muchas especies pertenecientes al género *Burkholderia* tienen la habilidad de producir compuestos con actividad antimicrobiana (Hu y Young, 1998; Kang *et al.*, 1998) que pueden ser potencialmente usados como agentes de biocontrol de hongos fitopatógenos. Esto ha sido demostrado muy bien con muchas especies pertenecientes al complejo *B. cepacia*.

La actividad antagónica de *B. cepacia* ha sido atribuida a la producción de compuestos extracelulares que incluyen proteasas, hemolisinas, lecitinasas y lipopolisacáridos, además de compuestos con actividad antibiótica, algunos de los cuales poseen actividad antifúngica, como Cepacidine A, Cepacidine B, Xylocandin y Pyrrolnitrin. Sin embargo, compuestos como Cepacin A y Cepacin B solo exhiben actividad antibacteriana. Los lipopeptidos inhiben fuertemente el crecimiento de algunos hongos del suelo, especialmente, *Pythium ultimum* y *Collectotrichium sp.*, pero tiene poco efecto sobre *Candida albicans*, otras levaduras y algunos hongos

filamentosos patógenos o no. Cepacidin es un glucopéptido con una potente actividad antifúngica, pero no tiene actividad sobre bacterias. Cepacidine A y B son compuestos fungotóxicos que han demostrado una gran actividad sobre *Botrytis cinerea* y *Penicillium expansum* (Parker *et al.*, 1984; Abe y Nakazawa, 1993; Lee *et al.*, 1994; El-Banna *et al.*, 1998).

Recientemente, Pandey *et al.* (2005) reportó un compuesto, ACC (1-amino-ciclopropano-1-carboxylato deaminasa), con actividad antagónica contra *Rhizoctonia solani* y *Sclerotinia sclerotiorum* aislado de una especie de *Burkholderia* endófito. Igualmente encontró que la ACC desaminasa puede actuar sinérgicamente con otros mecanismos de control biológicos reduciendo los síntomas desarrollados sin tener efecto sobre la densidad poblacional del agente patógeno (Wang *et al.*, 2000).

Algunos miembros del complejo *B. cepacia*, pueden actuar directamente estimulando el crecimiento de la planta. Por ejemplo, la inoculación de cultivos como el maíz o el sorgo han incrementado la biomasa de raíces y tallo (Chiarini *et al.*, 1998; Bevivino *et al.*, 2000). La promoción del crecimiento de *B. cepacia* probablemente se deba a la combinación de mecanismos que envuelven tanto a la planta como a la bacteria. Las rizobacterias facilitan el crecimiento de la planta previniendo la proliferación del organismo patógeno o estimulando directamente el crecimiento mediante la adquisición de fuentes nutricionales como nitrógeno, fósforo y hierro, u hormonas como auxinas o citokininas; también pueden disminuir los niveles de etileno a través de la acción de la enzima ACC desaminasa (Glick *et al.*, 1999; Vessey, 2003).

Se ha demostrado que la promoción del crecimiento en las plantas, inducida por la especie *B. vietnamiensi*, se debe a la producción de fitohormonas y la fijación del nitrógeno atmosférico por la bacteria. Se han aislado nuevas especies de *Burkholderia* diazotróficas de plantas de maíz y café (Estrada de los Santos *et al.*, 2001). Algunos

miembros del género expresan una enzima (fosforibosil-quinolato-transferasa) que está envuelta en la promoción del crecimiento de las plantas, así como altos niveles de ACC desaminasa. Esta última hidroliza la ACC a amonio y  $\alpha$ -cetobutirato, disminuyendo a su vez los niveles de etileno en las plantas (Glick, *et al.*, 2007). Sin embargo, es importante señalar que la actividad de la ACC desaminasa o los genes asociados también pueden estar presentes en miembros del género *B. cepacia* considerados como fitopatógenos. Recientemente, Blaha, *et al.* (2006), demostró la presencia de genes que codifican para la ACC desaminasa (*acdS*) en algunas especies de *Burkholderia*, incluyendo PGPR (bacterias promotoras del crecimiento de las plantas), fitopatógenas e inclusive patógenos humanos oportunistas.

Las enfermedades ocasionadas por hongos causan pérdidas millonarias en la agricultura, además, algunos de ellos producen compuestos que son tóxicos al consumidor (micotoxinas). Los fungicidas son la primera elección para el control de estas infecciones, pero su uso es controversial debido a los efectos ambientales indeseables que ocasionan (McSpadden, 2001).

Los problemas ambientales causados por el uso de biopesticidas representan una preocupación a nivel mundial, sin embargo, las investigaciones relacionadas con alternativas básicas que guíen políticas de manejo de pesticidas, hasta la fecha, han sido infructuosas. La aplicación de microorganismos rizosféricos es una alternativa, en biotecnología, a los quimiotóxicos que además de ser altamente contaminantes y peligrosos a la salud, resultan costosos, principalmente en países subdesarrollados (Anauratha y Gnanamanickam, 1990).

*B. cepacia* ha sido caracterizada no sólo por su extraordinaria versatilidad metabólica, también por la inusual organización de su genoma que juega un papel muy importante en la capacidad de esta especie de desarrollar nuevas funciones y de

adaptarse a diferentes ambientes. Sin embargo los riesgos asociados con la utilización de esta bacteria como agente de control biológico no están aún claros, y su uso no se recomienda hasta conocer más sobre los efectos ambientales de algunos de los miembros del complejo *B. cepacia* y cómo afectan las condiciones de cultivo, el poder o la actividad antimicrobiana que ellas desarrollan (Govan y Deretic, 1996; Govan *et al.*, 1996; Gilligan, 1999; Lipuma *et al.*, 2002; Speert *et al.*, 2000).

Especies de *Burkholderia* han sido encontradas como endófitas de plantas diferentes al huésped original de la misma. Así, *B. phytofirmans* originalmente aislada de raíces de cebolla en asociación simbiótica con el hongo *Glomus vesiculiferum* puede establecer rápidamente poblaciones rizosféricas y endófitas en plantas de papa, tomate, melón (Frommel *et al.*, 1991; Ait Barka, *et al.*, 2000; Nowak y Shulaev, 2003; Compant *et al.*, 2005). El uso de bacterias endófitas para el control de enfermedades de plantas es importante porque la bacteria puede actuar como protector biológico de microambientes específicos así como inducir el metabolismo de las plantas a responder rápidamente ante condiciones de stress. Así mismo, las bacterias endófitas son más efectivas que las de vida libre colonizando raíces y hojas porque forman asociaciones cerradas con la planta (Compant, *et al.*, 2005).

El presente trabajo de investigación representa un aporte a la búsqueda de alternativas para la disminución del uso de compuestos químicos que contribuyen a la acumulación de residuos tóxicos en los alimentos y en el ambiente con serias consecuencias a la salud humana. Desde el punto de vista económico esto reduciría costos, debido a que se estarían explotando recursos ya existentes. Así como también tendría un impacto ecológico ya que se podría tratar enfermedades en cultivos agrícolas en forma natural únicamente trabajando con la manipulación de un microorganismo antagónico que no alteraría el ecosistema existente en la microflora

de la raíz en las plantas. Por ello el objetivo de este estudio fue evaluar la actividad antifúngica de *B. cepacia* aislada de maíz amarillo (*Zea mays*) bajo diferentes condiciones de cultivo.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### 1.1. Muestreo

Para la realización del presente trabajo se recolectaron muestras de rizósfera de maíz amarillo (*Zea mays* L.) en cuatro plantaciones ubicadas en el municipio Montes del estado Sucre, Venezuela, durante los meses abril y septiembre de 2006. Las plantaciones fueron la Finca “San Baltazar” en Cumanacoa (Plantación 1), Fincas “El Rosario” (Plantación 2) y “La Granja” (Plantación 3) ubicadas en el Valle de Cumanacoa y la Finca “Neverí” (Plantación 4) ubicada en Cocollar.

Los muestreos se realizaron siguiendo la técnica de recolección de muestras vegetales descrita por López y López (1990) en parcelas de aproximadamente 10.000 m<sup>2</sup>. Cada parcela se dividió en unidades de muestreo, las cuales consistieron en un conjunto de plantas, visualmente parecidas, con el mismo vigor, el mismo tiempo de desarrollo, estaban en el mismo tipo de suelo, y a las que se les practicó las mismas técnicas culturales. Las plantas fueron representativas de la unidad de muestreo en cuanto a color, textura, tratamientos y cultivos. Se tomaron de 2 a 3 muestras en cada parcela (el número de muestras dependió de la variabilidad o heterogeneidad de la parcela) utilizando la técnica de zig-zag (figura 1).

Se extrajeron plantas de maíz en diferentes estadios del desarrollo, se removió la tierra cercana a la raíz (aproximadamente 10 cm de profundidad) y se tomaron muestras de rizósfera de estas plantas. Las raíces de las plantas se sacudieron suavemente eliminando el suelo en exceso, quedando presente sólo el suelo rizosférico y el del rizoplano (en contacto con la raíz).



**Figura 1.** Plantación de maíz amarillo. Finca San Baltazar. Cumanacoa. Septiembre, 2006.

Luego se colocaron todas las muestras en una bolsa común y fueron trasladadas al Laboratorio de Micología del Departamento de Bioanálisis (U.D.O., Sucre) para su procesamiento.

Posteriormente, se procedió a eliminar el suelo adherido a la rizósfera de cada una de las plantas, el cual se desprendió mediante un lavado con agitación constante (vortex) durante una 15 min.



**Figura 2.** Rizósfera de maíz amarillo (*Zea mays* L.). Plantaciones del Municipio Montes. Septiembre, 2006.

## **1.2. Aislamiento de las colonias bacterianas**

Para el aislamiento de las colonias bacterianas se siguió el método descrito por Di Cello *et al.*,1997. Se agregaron 10g de cada muestra de rizósfera en un erlenmeyer que contenía 90ml de solución isotónica de cloruro de sodio al 0,9%, luego se mezcló en shaker (Precision Scientific) durante 10 minutos. Se prepararon tubos con 9 ml de Solución salina fisiológica y se realizaron diluciones seriadas hasta  $10^{-8}$ .

Se realizaron las siembras por agotamiento en superficie tomando 100  $\mu$ l, de cada dilución y se dispensaron en placas de petri con agar nutritivo para el conteo total de bacterias del suelo, medio de cultivo no selectivo como agar Luria-Bertani (LB) adicionado con Polimixina B (600 U) para el aislamiento de *B. cepacia*, y medio selectivo como agar BC (Oxoid, England) y agar MacConkey (Difco, U.S.A.) para el aislamiento de enterobacterias, las placas se incubaron a 30°C durante 24 a 48 horas.

A todos los medios se les adicionó cicloheximida al 1% para evitar o disminuir el crecimiento de hongos.

Se realizaron tres repeticiones por cada dilución y para cada una de las muestras, expresando los resultados como UFC·g<sup>-1</sup> de suelo seco, realizando los cálculos correspondientes en cada caso.

## **1.2. Caracterización morfológica de las colonias**

Las colonias aisladas fueron caracterizadas morfológicamente según el color, consistencia, tamaño, margen y la presencia de pigmento difusible. A cada una se le realizó coloración de Gram. Luego fueron purificadas transfiriéndolas a placas con agar LB adicionado con Polimixina B (600 U).

## **1.4. Caracterización bioquímica e Identificación de *Burkholderia cepacia***

A todas las colonias aisladas se les realizó las siguientes pruebas: Oxidasa (tetramethyl p-phenyldiamine dihydrochloride 1%), reacción a la lisina descarboxilasa, resistencia a la Polimixina B y oxidación de azúcares (glucosa, sucrosa, lactosa y manitol al 10%) en medio oxidación- fermentación, siguiendo los procedimientos y esquemas de diagnósticos establecidos para el aislamiento e identificación de bacilos Gram negativos No Fermentadores de Glucosa descritas por McMenamin *et al.* (2000) y Koneman *et al.* (1999). Los aislados fueron luego identificados utilizando el sistema comercial de diagnóstico rápido API 20NE (BioMérieux, France).

## **1.5. Cepas y Condiciones de Cultivo**

Para el presente estudio se utilizaron, además de las cepas de *B. cepacia* obtenidas de rizósfera de maíz, una cepa certificada de origen ambiental CVC626

(ATCC 25416) y un aislado de origen clínico (CVCM 1328), provenientes del Centro Venezolano de Colección de Microorganismos, con la finalidad de comparar la acción de las mismas. Todas las cepas de *B. cepacia* fueron mantenidas en caldo Tripticasa Soya (Difco) con Glicerol al 15%.

Las cepas fúngicas en las que se probó el poder antagónico fueron *Fusarium solani*, *Fusarium moniliforme*, *Aspergillus niger*, *Penicillium expansum*, *Trichoderma viride*, las cuales pertenecen al Cepario del Laboratorio de Micología del Departamento de Bioanálisis, UDO-Sucre. Las mismas fueron mantenidas en tubos con agar Papa Dextrosa (HiMedia, India).

#### **1.6. Subcultivo de las Cepas Bacterianas**

Las cepas de *B. cepacia* fueron subcultivadas en caldo nutritivo. Luego se incubaron en Shaker (Precision Scientific), a 30°C durante 18 a 24 horas o hasta observar crecimiento (turbidez). Posteriormente, fueron sembradas en agar Luria Bertani (LB) o Agar Nutritivo (Oxoid, England), incubadas a 30°C durante 18-24 horas.

#### **1.7. Determinación de la Actividad Antifúngica**

##### **1.7.1. Efecto Antagónico de *B. cepacia*.**

A todas las cepas de *B. cepacia* aisladas se les comprobó su habilidad de inhibir el crecimiento de los hongos fitopatógenos antes mencionados, utilizando métodos directos e indirectos en placas de Petri que contenían agar Papa Dextrosa (Difco) y Medio M9 (Miller, 1972).

### 1.7.2. Método Directo

Se inocularon colonias de *B. cepacia* en la superficie de las placas de Petri que fueron diseminadas previamente con 100 µl de una suspensión de conidios de cada uno de los hongos con concentraciones de  $10^4$  a  $10^5$  conidios/ml en NaCl 0,9% (Bell *et al.*, 1982).

### 1.7.3. Método Indirecto

Se dispensaron 100 µl de suspensión de conidios, de cada hongo estudiado, en placas con agar Papa Dextrosa (Difco, USA) y agar M9 (Miller, 1972), y luego se diseminaron por agotamiento en superficie con asa de Digraslky. Se colocaron dos discos de agar de 6mm de diámetro, de cultivos de *B. cepacia* (18-24 horas de desarrollo) sobre las placas que contenían los cultivos fúngicos, uno haciendo contacto por la zona del desarrollo microbiano y otro por la zona del medio de cultivo. Simultáneamente, en cada placa se probaron discos que contenían únicamente medio de cultivo, como control, y una placa que contenía solo los discos de agar con la cepa bacteriana para comprobar su viabilidad. Las placas fueron incubadas a 30°C durante 3 a 5 días. Al finalizar este tiempo se midieron los halos inhibitorios producidos. Las pruebas se realizaron por triplicado (Mitidieri, 1988).

### 1.7.4. Lectura de los halos de Inhibición.

Después del tiempo de incubación se procedió a leer el diámetro de las zonas de completa inhibición con un pie de rey o regla. Los resultados se expresaron en milímetros (mm).

Además se observó la inhibición, total o parcial, de la esporulación en los hongos, ocasionada por el contacto con las cepas bacterianas a estudiar.

## **1.8. Determinación del Efecto de las condiciones de Cultivo en la Actividad Antifúngica**

Para medir el efecto de diferentes condiciones de cultivo sobre la actividad antifúngica de *B. cepacia* se empleó el medio M9 (Miller, 1972), que ofrece las condiciones fisiológicas necesarias para el desarrollo tanto de *B. cepacia* como de los hongos a estudiar; la composición del medio es la siguiente: Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 6 g; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 3 g; NaCl, 0.5g; NH<sub>4</sub>Cl, 1g y agua destilada c.s.p., 1000 ml; mediante la técnica descrita por Upadhyay *et al.* (1991).

### 1.8.1. Influencia de la fuente de carbono sobre la actividad antifungica de *B. cepacia*

Se utilizaron las siguientes fuentes de carbono: xylosa, fructosa, manosa, maltosa, sucrosa, glucosa y lactosa, cada una de las cuales se adicionaron, por separado, al medio M9 a una concentración final de 0,2% p/v.

### 1.8.2. Influencia de la fuente de nitrógeno sobre la actividad antifungica de *B. cepacia*

Como fuentes de nitrógeno se utilizaron los aminoácidos cisteína, valina, lisina, arginina leucina y alanina, cada uno de los cuales fueron adicionados, por separado, al medio M9 hasta una concentración final de 0,1%.

### 1.8.3. Efecto del pH sobre la actividad antifúngica de *B. cepacia*

El efecto del pH fué evaluado ajustando el medio M9 con NaOH y HCl, a diferentes intervalos de 0,5 unidades en un rango de pH de 3,5 a 9,0 , el cual fue medido en Phmetro (GLP 540).

#### 1.8.4. Efecto de la temperatura sobre la actividad antifúngica de *B. cepacia*

El efecto de la temperatura sobre la actividad antifúngica de la bacteria se determinó utilizando las siguientes temperaturas: 25, 30, 35 y 40°C para el crecimiento de *B. cepacia*.

### 1.9. Aislamiento y Purificación de los posibles compuestos antifúngicos.

#### 1.9.1. Extracción de metabolitos activos de las cepas de *B. cepacia*.

Las cepas de *B. cepacia* (provenientes de un cultivo de 24 horas) a estudiar fueron inoculadas en un erlenmeyer de 500 ml de capacidad que contenía 200 ml de caldo nutritivo (Oxoid, England ) y dejadas a 30°C (temperatura ambiente) en rotación (shaker) a 240 rpm hasta su crecimiento. La actividad antimicrobiana de *B. cepacia* aumenta durante la fase estacionaria para una máxima actividad a las 120 h (El-Banna and Winkelmann, 1998). Basándonos en estos datos, el período de incubación de *B. cepacia* fue fijado a 5 días con el fin de obtener una máxima producción de sustancias antifúngicas.

Luego, se centrifugó durante 20 minutos a 5000 rpm para separar las células del medio de cultivo. Se acidificó el sobrenadante con ácido trifluoroacético (TFA) al 10% hasta llegar a un pH 2 ó 3. Se centrifugó a 1500 rpm durante 15 min para extraer residuos insolubles (Bernal *et al.*, 2002). El extracto fue conservado en refrigeración para realizar cromatografía, previo a esto, se comprobó la actividad antifúngica del compuesto obtenido según el método de excavación en placas (Mitidieri, 1998); para ello, se prepararon placas de agar M9 inoculado con el hongo (*T. viride*) seguidamente, de manera aséptica, se hicieron pozos de 6mm de diámetro y se procedió a colocar con micropipeta, 100µl del metabolito activo extraído. Se permitió la difusión de la sustancia activa durante 20 a 30 min y se incubaron las

placas a 30 °C durante 72 horas. Se ensayò un aplaca control con ácido trifluoroacético al 10%. Finalmente, se determinó el porcentaje de inhibición producido por el extracto de metabolitos activos de las cepas de *B. cepacia* sobre *T. viride*.

#### 1.9.2. Cálculo del Porcentaje de Inhibición:

El porcentaje de inhibición del hongo fué calculado utilizando la siguiente formula:

$$\frac{r1 - r2}{r1} \times 100 \text{ (Whipps, 1987)}$$

donde:

r1 = distancia de crecimiento del hongo en dirección a la bacteria antagonista

r2 = distancia entre el hongo y la bacteria (zona de inhibición)

### **1.10. Determinación de Compuestos antifúngicos mediante Cromatografía en Capa Fina (TLC)**

La determinación de los compuestos antifúngicos de las cepas de *B. cepacia* se realizó siguiendo la metodología descrita por Jayaswal *et al.* (1990). Para ello, se tomó el sobrenadante acidificado y se le agregó 1,5 volúmenes de acetato de etilo (80%). Se agitó vigorosamente, luego se centrifugó durante 10 minutos a 5000 rpm para separar las fases. Se conservó la fase orgánica (superior), luego se hizo una segunda extracción de la fase acuosa con acetato de etilo. Se secó el solvente con rotaevaporador (Buchii R-200) y fue concentrado hasta 280 ml. Se centrifugó a 1500 rpm durante 15 min para extraer residuos insolubles.

Se procedió determinar los compuestos antifúngicos de las fracciones colectadas, suspendiéndolas en 10 ml metanol, mediante Cromatografía en capa fina utilizando cromatofolios de sílica gel (Merck<sup>®</sup>, N.J.) Como fase móvil de emplearon varias mezclas de solventes: Cloruro de etilo-metanol (9:1, v/v), Cloruro de etilo-acetona (4:1, v/v), Cloruro de etilo-acetato de etilo (9:1, v/v), Cloroformo-acetona (9:1, v/v), hexano-acetona (3:1 v/v) . Luego de la corrida, las placas se observaron con Luz Ultravioleta (UV) a 315nm, luego se reveló con vapores de yodo. Se procedió luego a eluir los compuestos de la placa, recortando en pequeños pedacitos la banda, se colocaron en 10 ml de acetona y se agitó durante 1 hora. Se centrifugó por 10 min a 10000 rpm. Se retiró el solvente con pipeta pasteur y se evaporó a baja presión. El residuo se conservó en nevera.

Posteriormente, se procedió a medir la actividad antifúngica de cada fracción obtenida cargando discos de papel filtro (Watman N 5) con el compuesto a ensayar disuelto en solvente volátil (acetona al 10%), se dejó evaporar el solvente y se le midió la actividad antifúngica utilizando la técnica de excavación en placas de Petri, ya descrita. Se probó la actividad del solvente adicionalmente en otra placa.

#### Análisis Estadístico

Las pruebas se elaboraron por triplicado, con el fin de controlar las diferencias en los efectos antifúngicos, se midió el diámetro de los halos de inhibición formados (en milímetros) y se aplicó análisis de varianza de una vía (ANOVA) con un nivel de confianza del 95% . Aquellos resultados que presentaron diferencias significativas se les aplicó la prueba de Tukey (Zar, 1984).

## RESULTADOS

### **Aislamiento y caracterización fenotípica de *B. cepacia* aisladas de maíz amarillo (*Zea mays* L)**

En la tabla 1 se muestra la población bacteriana presente en la rizósfera de maíz de las diferentes plantaciones estudiadas y la flora bacteriana total. Estos resultados muestran que no hubo diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) en los niveles poblacionales de la flora bacteriana en las diferentes plantaciones del Municipio Montes estudiadas; encontrándose predominando en la rizósfera de maíz al género *Pseudomonas* (22,8%) seguido de *Burkholderia* y *Azospirillum* (con 17,9% y 17,1% respectivamente).

Las características morfológicas y bioquímicas de las cepas de *B. cepacia* aisladas de las plantaciones de maíz en el Municipio Montes se muestran en la tabla 2. Todas las cepas demostraron ser bacilos Gram negativos, rectos o ligeramente curvos, de 0,5 a 1,5  $\mu\text{m}$  aproximadamente. Se pudo obtener buen crecimiento en agar MacConkey a una temperatura de 30°C. En cuanto a sus características morfológicas las cepas mostraron un patrón uniforme en la forma, tamaño y color, reflejándose como cepas lactosa negativa en el medio de agar MacConkey, pequeñas, redondas, de bordes lisos, y el 52,6% de las cepas presentaron un ligero color amarillento en agar nutritivo. Se utilizaron las pruebas de Kligler, OF, oxidasa y catalasa, para determinar que no eran bacterias entéricas.

De las 19 cepas identificadas como *B. cepacia*, todas resultaron ser oxidasa positiva, las pruebas de Oxidación–Fermentación de azúcares mostraron que la mayoría de las cepas eran positivas para glucosa, maltosa y sacarosa, pero 11 (57,9%) fueron positivas para manitol. Todas las cepas resultaron ser motilidad

positiva, Lisina positiva y Polimixina B (300U) resistentes. En el caso de la pruebas de hidrólisis

**Tabla 1.** Géneros bacterianos asociados a rizósfera de maíz (*Zea mays* L) y flora bacteriana total (promedios de UFC/g de rizósfera) en las cuatro plantaciones de estudio. Municipio Montes, estado Sucre. Abril-Septiembre de 2006.

Género	Plantaciones								TOTAL	
	1		2		3		4			
	UFC/g	%	UFC/g	%	UFC/g	%	UFC/g	%	UFC/g	%
<i>Pseudomonas</i>	2,5x10 <sup>6</sup>	29,4	2,2x10 <sup>6</sup>	26,1	1,7x10 <sup>6</sup>	18,5	1,5x10 <sup>6</sup>	20,0	7,9x10 <sup>6</sup>	22,8
<i>Azospirillum</i>	1,5x10 <sup>6</sup>	17,6	1,2 x10 <sup>6</sup>	14,3	2,4x10 <sup>6</sup>	26,1	1,1x10 <sup>6</sup>	14,6	6,2x10 <sup>6</sup>	17,9
<i>Burkholderia</i>	1,3x10 <sup>6</sup>	15,3	1,6x10 <sup>6</sup>	19,0	2,0x10 <sup>6</sup>	21,7	1,0x10 <sup>6</sup>	13,3	5,9x10 <sup>6</sup>	17,1
<i>Azotobacter</i>	1,1x10 <sup>6</sup>	12,9	0,8x10 <sup>6</sup>	9,5	1,1x10 <sup>6</sup>	11,9	1,5x10 <sup>6</sup>	20,0	4,5x10 <sup>6</sup>	13,0
<i>Bacillus</i>	0,9x10 <sup>6</sup>	10,6	1,7x10 <sup>6</sup>	20,2	0,6x10 <sup>6</sup>	6,5	0,8x10 <sup>6</sup>	10,6	5,0x10 <sup>6</sup>	14,5
<i>Rhizobium</i>	0,5x10 <sup>6</sup>	5,9	0,4x10 <sup>6</sup>	4,8	0,8x10 <sup>6</sup>	8,7	0,9x10 <sup>6</sup>	12,0	2,6x10 <sup>6</sup>	7,5
<i>Enterobacter</i>	0,4x10 <sup>6</sup>	4,7	0,5x10 <sup>6</sup>	5,9	0,6x10 <sup>6</sup>	6,5	0,0x10 <sup>6</sup>	0,0	1,5x10 <sup>6</sup>	4,3
<i>Klebsiella</i>	0,3x10 <sup>6</sup>	3,5	0,0x10 <sup>6</sup>	0,0	0,0x10 <sup>6</sup>	18,5	0,7x10 <sup>6</sup>	9,3	1,0x10 <sup>6</sup>	2,9
<b>Flora Total</b>	<b>8,5x10<sup>6</sup></b>		<b>8,4x10<sup>6</sup></b>		<b>9,2x10<sup>6</sup></b>		<b>7,5x10<sup>6</sup></b>		<b>3,46x10<sup>7</sup></b>	

**Tabla 2.** Características morfológicas y bioquímicas de las cepas de *Burkholderia cepacia* aisladas de maíz amarillo (*Zea mays* L) en cuatro plantaciones del Municipio Montes, estado Sucre. Abril-Septiembre 2006.

Características	Resultado	Nº cepas	%
<b>Morfológicas</b>			
Gram	-	19	100
Motilidad	+	19	100
Pigmento	amarillo	10	52,6
<b>Bioquímicas</b>			
Oxidasa	+	19	100
Kligler alc/alc	+	19	100
OF Glucosa	+	19	100
OF Maltosa	+	19	100
OF Manitol	+	11	57,9
OF Sacarosa	+	17	89,5
OF Xilosa	+	15	78,9
Adonitol	+	14	73,7
Lisina descarboxilasa	+	19	100
Ornitina descarboxilasa	-	5	26,3
Arginina dihidrolasa	-	19	100
Gelatina	+	15	78,9
Hidrólisis de esculina	+	11	57,9
Polimixina B (300U)	R	19	100

OF: oxidación-fermentación

de la esculina y licuación de la gelatina el mayor porcentaje de las cepas resultaron positivas a estas pruebas. Estos resultados permitieron caracterizarlas bioquímicamente, resultando la presencia de cuatro variaciones fenotípicas, y siendo las características, correspondiente a la variación 1, las más frecuentes en el grupo de cepas de *B. cepacia* aisladas (Tabla 3).

La caracterización bioquímica y fisiológica, de las cepas de *B. cepacia* aisladas de rizósfera de maíz, utilizando el kit comercial API 20NE confirmó los resultados obtenidos por el método convencional. A pesar de que la identificación utilizando este kit es mucho más rápida y sencilla resulta muy costosa para la identificación del gran número de cepas que se obtienen del suelo.

Las cepas crecieron a temperaturas entre 20 y 45°C, pero el crecimiento óptimo se obtuvo a 30°C. No se observó crecimiento de las cepas a pH menores de 3 o mayores de 9, el máximo crecimiento se obtuvo a pH 6.

La tabla 4 muestra las variaciones fenotípicas en las características mostradas por las distintas cepas de *B. cepacia* aisladas en diferentes plantaciones, no observándose diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre ellas, la variación 1 y la 2 resultaron ser las más frecuentes en las cuatro plantaciones; observándose la variación 3 sólo en la plantación 2.

**Tabla 3.** Variaciones fenotípicas de identificación bioquímica de las cepas de *Burkholderia cepacia* aisladas de Maiz amarillo (*Zea mays* L) en cuatro plantaciones del Municipio Montes, estado Sucre. Abril-Septiembre 2006.

Variedad	N	OX	GLU	MAN	LAC	SAC	XIL	ADO	LIS	ORN	ARG	GEL	ESC	PB
1	9	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	R
2	5	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	R
3	3	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	R
4	2	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	R

N: número de cepas; OX: oxidasa; GLU: glucosa; MAN: manitol; LAC: lactosa; SAC: sacarosa; XIL: xilosa; ADO: adonitol; LIS: lisina; ARG: arginina; ESC: esculina; GEL: gelatina; PB: Polimixina B (300U)

**Tabla 4.** Variedades fenotípicas de los aislados de *B. cepacia* en las diferentes plantaciones del Municipio Montes, estado Sucre. Abril-Septiembre 2006.

Variación	Plantaciones							
	1		2		3		4	
	n	%	n	%	N	%	n	%
1	5	62,5	7	70,0	8	66,7	5	45,4
2	2	25,0	1	10,0	4	33,3	4	36,4
3	0	0,0	2	20,0	0	0,0	0	0,0
4	1	12,5	0	0,0	0	0,0	2	18,2

n: número de cepas

### **Actividad Antifúngica de *Burkholderia cepacia***

#### **Método Directo**

Las propiedades antifúngicas de las cepas de *B. cepacia* frente a varios fitopatógenos importantes determinadas por el método directo de enfrentamientos duales se muestra en la tabla 5. Para ello se escogieron cuatro de las cepas, una de cada plantación estudiada, que demostraron la mayor actividad antagónica frente a hongos estudiados, las cuales fueron nombradas de acuerdo al lugar de origen y al orden de identificación como: SB2, ER3, LG12 y N10.

Las cuatro cepas de *B. cepacia* (SB2, ER3, LG12 y N10), aisladas de rizósfera de maíz, mostraron una actividad antifúngica similar únicamente frente a *Trichoderma viride* con zonas de inhibición promedio de 8,5 , 8,8 , 9,9 y 8,0 mm, respectivamente, mientras que la mayor actividad se obtuvo con la cepa CVCM 626

(ATCC 25416) con un promedio de inhibición de 13,9 mm (ANOVA a: 0,05; F: 60,42; Tukey HSD a: 0,01). Sin embargo, se observó que las cepas SB2, ER3, LG12 ocasionaron una inhibición parcial de la esporulación de *Fusarium solani* y *Fusarium moniliforme* y una inhibición total de la esporulación de *Aspergillus niger* y *Penicillium expansum* observándose la formación de micelio aéreo estéril.

**Tabla 5.** Promedio (mm) de los halos de inhibición producidos por las cepas de *Burkholderia cepacia* frente a hongos fitopatógenos mediante enfrentamiento dual (método directo). Período de incubación 72 horas.

Microorganismo	Diámetros de Inhibición (mm)					
	SB2	ER3	LG12	N10	ATCC 25416*	CVCM 1282
<i>Trichoderma viride</i>	8,5	8,8	9,9	8,0	13,9	0,0
<i>Fusarium moniliforme</i>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Fusarium solani</i>	0,0	0,0	0,0	0,0	3,0	0,0
<i>Aspergillus niger</i>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Penicillium expansum</i>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

\*Cepa equivalente a CVCM 626

*Fusarium solani*, no presentó sensibilidad frente a las cepas SB2, ER3, LG12 y N10 pero sí fue inhibido por la cepa ATCC 25416 con una inhibición promedio de 3,0 mm. La cepa CVCM 1282, correspondiente a un aislado clínico, no demostró ningún tipo de antagonismo frente a los hongos fitopatógenos estudiados.



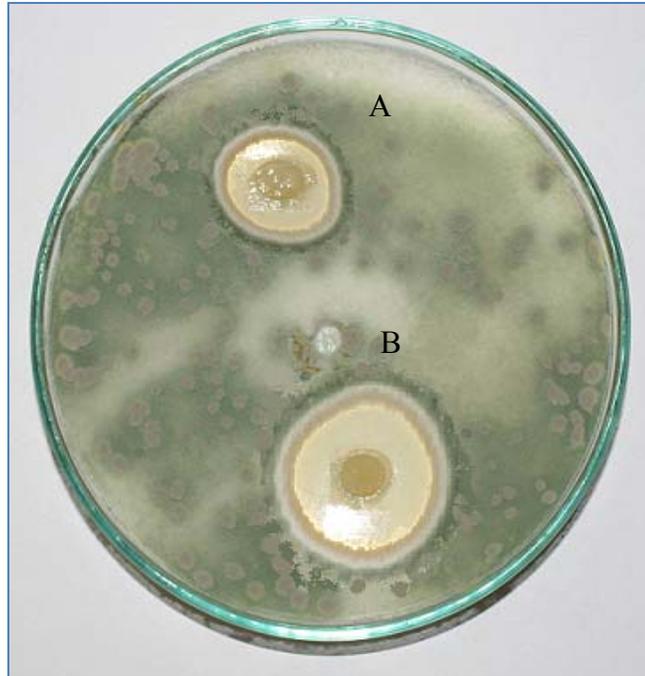
**Figura 3.** Inhibición de *Trichoderma viride* producida por una cepa de *Burkholderia cepacia* por el método directo de enfrentamientos duales.

### **Método Indirecto**

La tabla 6 muestra los promedios de halos de inhibición producidos por las cepas de *B. cepacia* frente a diferentes hongos, utilizando la técnica de discos de agar con cultivo de *B. cepacia* de 18 a 24 horas.

Se obtuvieron mayores halos de inhibición producidos por las cepas SB2, ER3, LG12, N10 y ATCC 25416 frente a *Trichoderma viride*, al colocar los discos de agar haciendo contacto directo con el microorganismo (A<sup>a</sup>) encontrándose promedios de halos de inhibición de (10 mm, 9,9 mm, 10,3 mm, 8,9 mm y 14,8 mm respectivamente), en comparación con los promedios de halos de inhibición obtenidos a partir de los discos de agar con cepas de *B. cepacia* haciendo contacto con el medio de cultivo (B<sup>b</sup>). En cambio, los halos de inhibición de la cepa ATCC 25416 frente a *Fusarium solani* aumentaron (A<sup>a</sup>= 3,0mm; B<sup>b</sup>= 4,1). La cepa ATCC 25416 demostró

una actividad antifúngica significativamente mayor que los aislados de maíz, con promedios de halos de inhibición de:  $A^a = 14,8\text{mm}$  y  $B^b = 10,9\text{mm}$  (ANOVA a: 0,05; F: 63,92; Tukey a: 0,01).



**Figura 4.** Inhibición de *Trichoderma viride* producida por una cepa de *Burkholderia cepacia* por el método indirecto. A: Disco de agar haciendo contacto con el medio de cultivo. B: Disco de agar haciendo contacto con el microorganismo.

**Tabla 6.** Promedio (mm) de halos de inhibición producidos por las cepas de *Burkholderia cepacia* frente a hongos fitopatógenos mediante la técnica de discos de agar (método indirecto). Período de incubación 72 horas.

Microorganismo	Diámetro Halos de Inhibición (mm)											
	SB2		ER3		LG12		N10		CVCM 626		CVCM 1282	
	A <sup>a</sup>	B <sup>b</sup>	A <sup>a</sup>	B <sup>b</sup>	A <sup>a</sup>	B <sup>b</sup>	A <sup>a</sup>	B <sup>b</sup>	A <sup>a</sup>	B <sup>b</sup>	A <sup>a</sup>	B <sup>b</sup>
<i>Trichoderma viride</i>	10,0	8,0	9,9	8,7	10,3	8,0	8,9	7,9	14,8	10,9	0,0	0,0
<i>Fusarium moniliforme</i>	0,0	2,0	0,0	2,0	0,0	2,6	0,0	2,4	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Fusarium solani</i>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	3,0	4,1	0,0	0,0
<i>Aspergillus niger</i>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	4,5	0,0	0,0	0,0
<i>Penicillium expansum</i>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

<sup>a</sup> Haciendo contacto con el medio de cultivo

<sup>b</sup> Haciendo contacto con el microorganismo

Debido a que el mayor efecto antagónico de las cepas de *B. cepacia* se demostró sobre *T. viride*, se utilizó sólo este hongo para los ensayos posteriores.

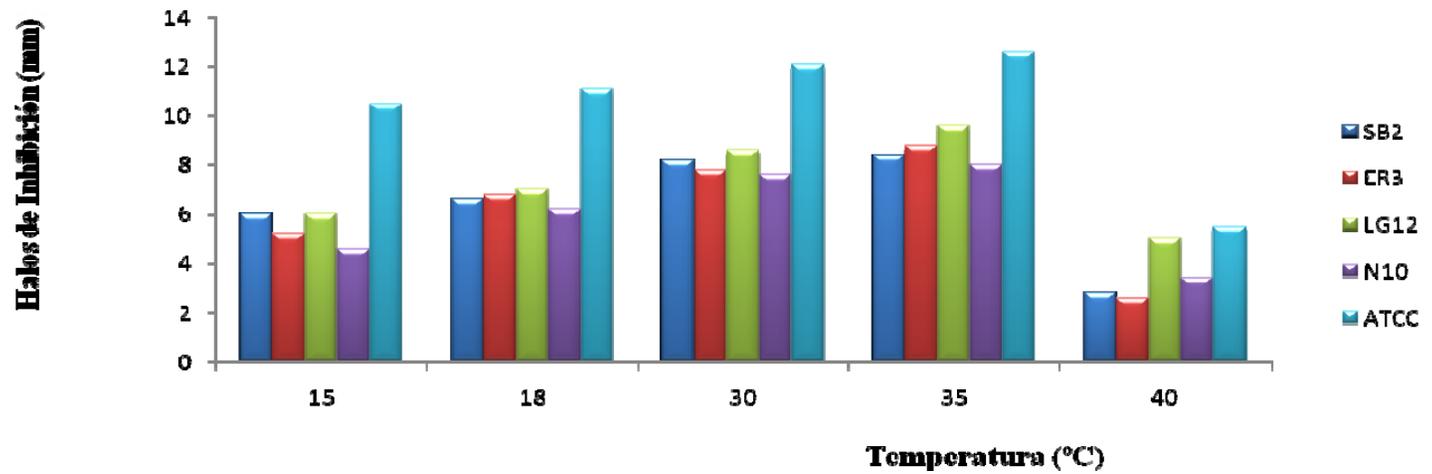
### **Efecto de las condiciones de cultivo sobre la actividad antifúngica**

El efecto de la temperatura sobre la actividad antifúngica de las cepas de *Burkholderia cepacia* frente a *Trichoderma viride* se muestra en la figura 3, demostrándose que la actividad es dependiente de la temperatura de crecimiento de la bacteria. La mayor actividad antifúngica se obtuvo en un rango de temperatura de 18 a 35°C, obteniéndose el mayor efecto inhibitorio cuando las cepas de *B. cepacia* ATCC, SB2, ER3, LG12 y N10 fueron incubadas a 35°C, mientras que a temperaturas menores o mayores de 35°C los halos de inhibición producidos por la bacteria contra *T. viride* fueron menores. A 40°C se inhibió tanto el crecimiento como la actividad antifúngica de las cepas bacterianas.

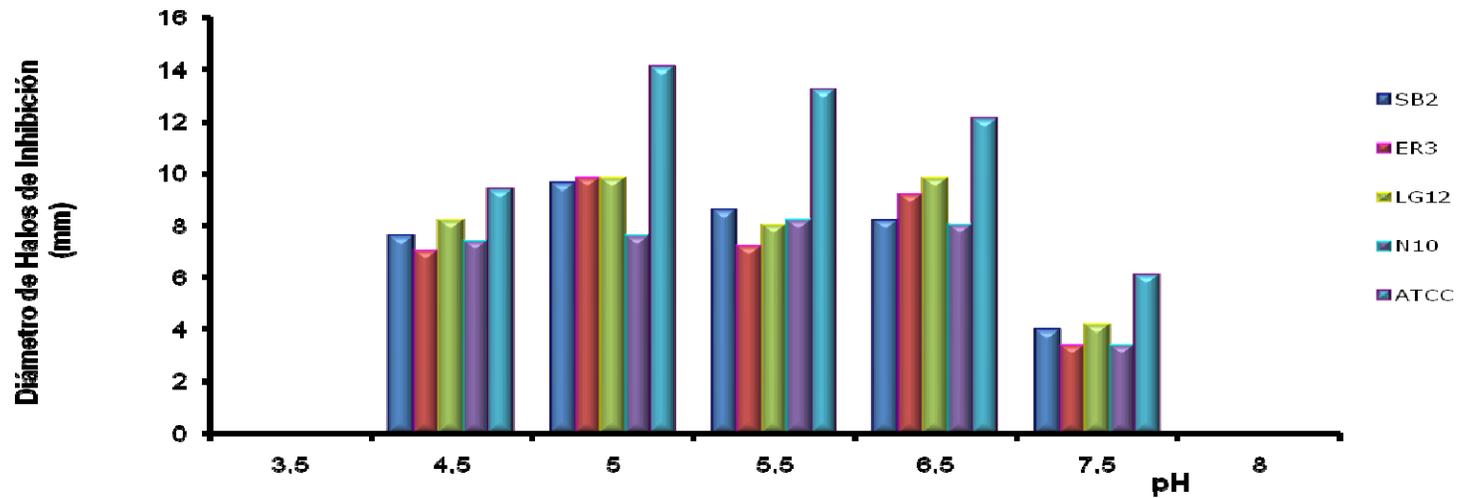
La actividad antifúngica de *B. cepacia* también es afectada por el cambio de pH (figura 4). Se observó actividad antifúngica de todas las cepas de *B. cepacia* en un rango de pH ácido (4,5 – 6,5). El máximo nivel de antagonismo se observó a pH 5, excepto con la cepa N10 que produjo el mayor antagonismo a pH 5,5.

No se produjeron halos de inhibición a pH 8,0 y 8,5, sin embargo, hubo crecimiento de las cepas de *B. cepacia* y todas produjeron pigmentación. Demostrando con esto que la producción de pigmento extracelular o no, por parte de la bacteria, no influye en la actividad antagónica de la misma. No se observó crecimiento de las cepas de *B. cepacia* a pH 3,5 y 9,0.

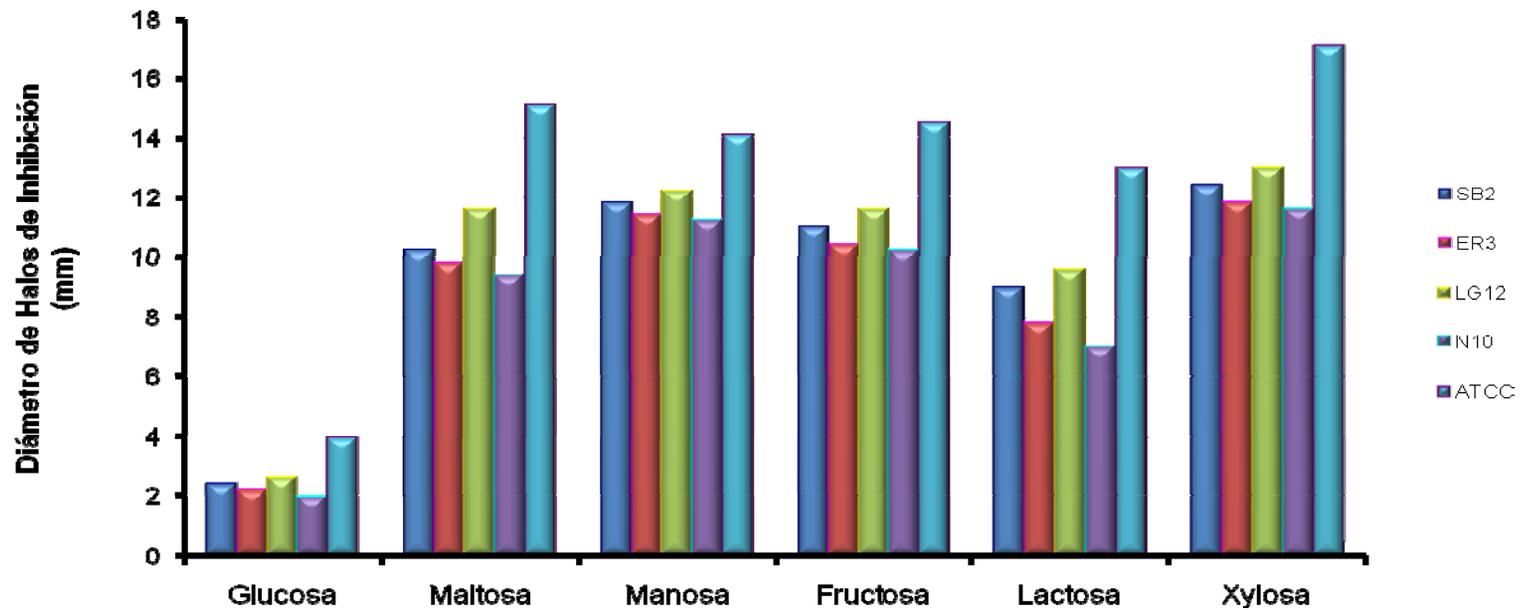
La figura 5 muestra que el efecto antagónico de las cepas SB2, ER3, LG12, N10 y ATCC 25416 contra *T. viride* fue mayor en presencia de xilosa y maltosa como



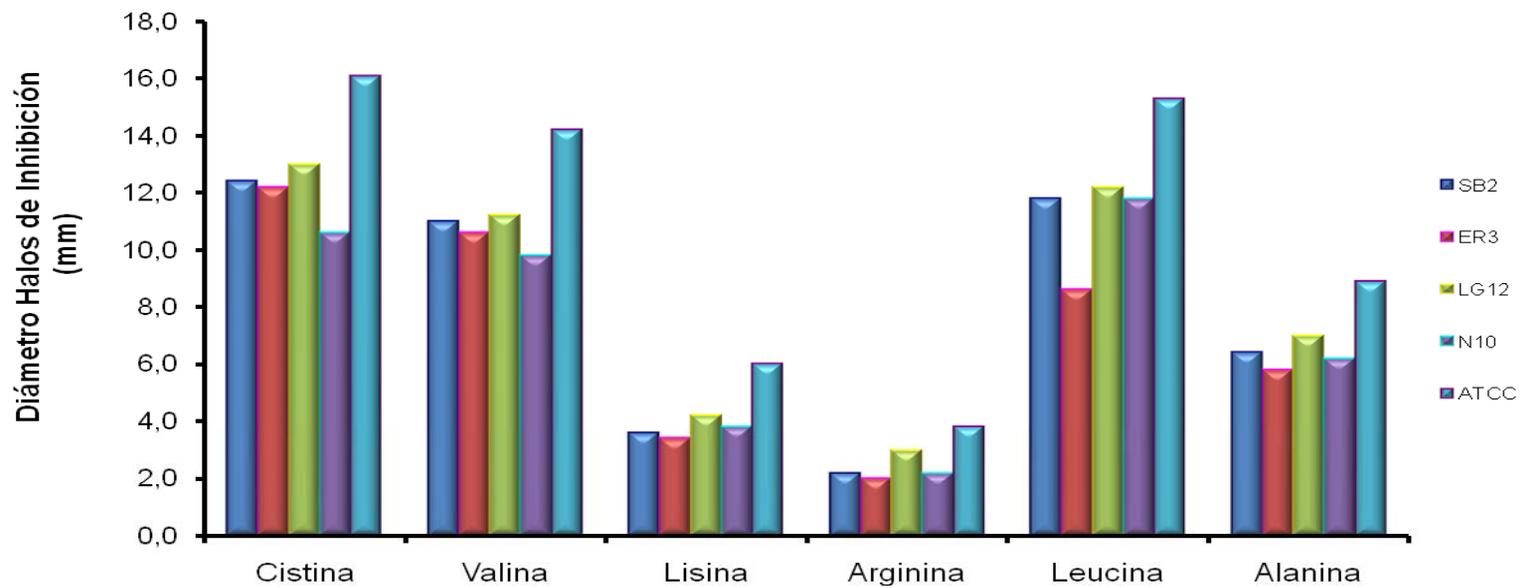
**Figura 5.** Efecto de la temperatura sobre la actividad antifúngica de cepas de *Burkholderia cepacia* en cepas aisladas de rizósfera de maíz amarillo (*Zea mays* L.) en diferentes plantaciones sobre *Trichoderma viride*. Municipio Montes, Estado Sucre. Abril-Septiembre de 2006.



**Figura 6.** Efecto del pH sobre la actividad antifúngica de cepas de *Burkholderia cepacia* aisladas de rizósfera de maíz amarillo (*Zea mays* L.) en diferentes plantaciones, sobre *Trichoderma viride*. Municipio Montes, Estado Sucre. Abril-Septiembre de 2006



**Figura 7.** Efecto de diferentes fuentes de carbono sobre la actividad antifúngica de cepas de *Burkholderia cepacia* aisladas de rizósfera de maíz amarillo (*Zea mays* L.) en diferentes plantaciones, sobre *Trichoderma viride*. Municipio Montes, Estado Sucre. Abril-Septiembre de 2006



**Figura 8.** Efecto de la variación de la fuente de nitrógeno sobre la actividad antifúngica de cepas de *Burkholderia cepacia* aisladas de rizósfera de maíz amarillo (*Zea mays* L.) en diferentes plantaciones, sobre *Trichoderma viride*. Municipio Montes, Estado Sucre. Abril-Septiembre de 2006

únicas fuentes de carbono, indicando que estos carbohidratos aumentan la producción de metabolitos antifúngicos de las cepas bacterianas, sin embargo, en presencia de glucosa y lactosa se redujeron notablemente los halos de inhibición.

La utilización de aminoácidos como única fuente de nitrógeno mostró variación en el nivel del antagonismo de las cepas de *B. cepacia* (figura 6). Obteniéndose aumento de los halos de inhibición producidos por todas las cepas bacterianas estudiadas en presencia de aminoácidos como cisteína, leucina y valina.

#### **Determinación de la actividad inhibitoria de metabolitos activos de las cepas de *B. cepacia* aisladas de rizósfera de maíz.**

Los metabolitos activos aislados de las cepas de *B. cepacia* demostraron actividad antifúngica frente a *T. viride* (Figura 9). El análisis de diluciones secuenciales de los extractos obtenidos de cada una de las cepas aisladas demostró que todas las diluciones empleadas inhibieron el crecimiento de *T. viride*, como se muestra en la tabla 7.



**Figura 9.** Inhibición producida por el extracto de metabolitos activos de *Burkholderia cepacia* sobre *Trichoderma viride*.

Todas las diluciones de los extractos que contenían los metabolitos provenientes de las cepas de *B. cepacia* resultaron ser efectivos inhibiendo el crecimiento de *T. viride*; sin embargo, se puede observar que los extractos más concentrados fueron los que produjeron un mayor porcentaje de inhibición. Cabe destacar que la esporulación del hongo fue inhibida por los metabolitos de todas las cepas de *B. cepacia*, indicando con esto que la esporulación es más sensible a la sustancia antifúngica comparado con el crecimiento vegetativo del hongo.

**Tabla 7.** Porcentaje de inhibición del crecimiento radial de *Trichoderma viride* ante diferentes diluciones de los metabolitos activos obtenidos de cada una de las cepas de *Burkholderia cepacia* aisladas de rizósfera de maíz.

Extracto	Inhibición en Porcentaje (%)				
	Dil 1:1	Dil 1:2	Dil 1:4	Dil 1:8	Dil 1:16
SB2	80,75	69,8	55,1	40,5	25,0
ER3	81,75	65,3	54,3	43,6	23,0
LG12	79,80	67,9	52,1	40,1	21,0
N10	75,70	63,2	50,8	38,7	15,0

Dil: dilución del metabolito activo.

Después de probar varias mezclas de solventes, el eluyente más apropiado en el presente trabajo resultó ser la mezcla hexano-acetona (3:1, v/v). Sin embargo, se probaron diferentes fracciones obtenidas por cromatografía, de los cuatro extractos de metabolitos activos de las cepas de *B. cepacia*, a las cuales se les realizó la prueba de actividad antifúngica frente a *T. viride*, y no se encontró actividad alguna sobre el hongo.

## DISCUSIÓN

El análisis de la estructura de la comunidad bacteriana de rizósfera de maíz (Tabla 1) demostró que los géneros *Pseudomonas* y *Burkholderia* constituyen una población dominante en relación con *Azospirillum*, *Bacillus* y *Rhizobium*. Es frecuente que *Pseudomonas* constituya estas poblaciones sobresalientes en la rizósfera, lo cual se explica por poseer un corto período de latencia, rápida velocidad de crecimiento y metabolismo versátil, además de producir una amplia gama de metabolitos secundarios, lo que le permite asociarse fuertemente a las raíces y multiplicarse con facilidad (Hernández *et al.*, 2002).

En este estudio se demostró que *Burkholderia* constituye un género dominante en la rizósfera de maíz de la variedad estudiada. Estudios de taxonomía polifásica, que involucran técnicas de Biología Molecular, han demostrado que *B. cepacia* es una rizobacteria comúnmente asociada a las plantas (Balandreau *et al.*, 2001). Los resultados obtenidos en la presente investigación coinciden con los obtenidos por Ramette *et al.* (2005), quienes examinaron la diversidad de especies pertenecientes al complejo *B. cepacia* en la rizósfera de plantas de maíz en Michigan, Estados Unidos; encontrando a *Burkholderia ambifaria* y *B. cepacia* (64% y 20% del total de aislados, respectivamente) como las especies mayormente aisladas.

Así mismo, otras especies como *B. multivorans*, *B. cenocepacia*, *B. stabilis*, *B. dolosa* y *B. pyrrocinia* también fueron encontradas sugiriendo que la rizósfera de maíz es una fuente ambiental rica en esta bacteria. Payne *et al.*, en el año 2005, ampliaron estos estudios en la rizósfera de maíz y aplicaron una aproximación utilizando cultivos independientes, basándose en la amplificación y análisis de secuencia del gen *recA* al ADN total extraído de las muestras de rizósfera aisladas

por Ramette *et al.* (2005), y encontraron nuevos filotipos. Igualmente, estudios realizados por Dalmastrì *et al.* (2007), basados en MLST, de las poblaciones del complejo *B. cepacia* asociadas a rizósfera de maíz en Italia, mostraron a *B. ambifaria* como la especie más comúnmente asociada con este cultivo. Sin embargo, a diferencia de los resultados de Ramette, nuevos grupos de *B. cepacia* (BCC5 y BCC6) se han encontrado dominando estos cultivos, sugiriendo que en diferentes localizaciones geográficas se pueden encontrar variaciones en las poblaciones del complejo *B. cepacia* asociadas al maíz (Dalmastrì *et al.*, 2007). Esto puede deberse a variaciones en las condiciones climáticas, tipo de suelo, prácticas agronómicas, así como las interacciones con otros microorganismos del suelo que pueden ocasionar variaciones genotípicas y fenotípicas en la comunidad microbiana (Schimel, 1995; Waldrop *et al.*, 2000). Esto debido a la composición de los exudados radicales y la relación carbono/nitrógeno de la rizósfera. Adicionalmente, es conocido que ante la liberación de exudados radicales ricos en fuentes de carbono, las bacterias pueden ser atraídas por proceso de quimiotaxis hacia la región rizosférica de la planta (Bacilio *et al.*, 2003). Es así como la especie vegetal puede incidir en la abundancia de cierto grupo microbiano en sus raíces.

Jiménez (1998) demostró la abundante presencia de este grupo en la rizósfera de otros cultivos de interés agrícola dado que, fundamentalmente *Burkholderia* también constituye una población sobresaliente en la rizósfera del cultivo de trigo. Asimismo, en un estudio de caracterización de la rizósfera del cultivo del maíz en tres localidades con diferentes condiciones climáticas y de suelo, se demostró que *B. cepacia* constituía uno de los géneros dominantes (Hernández, 1996). Igualmente, Jiménez (1998), encontró que en este cultivo las poblaciones de *Pseudomonas* y *Burkholderia* representan el 88 % de la microbiota total.

Por otra parte, el género *Azospirillum* se comporta como una población codominante. Bacterias de este género han sido aisladas de distintas regiones

geográficas a partir de una gran variedad de plantas pertenecientes a diferentes familias botánicas. Se ha encontrado dominando la rizósfera del cultivo del arroz en suelo Ferralítico Rojo compactado y Ferralítico amarillento caracterizados por una alteración intensa de los minerales y acumulación de óxidos e hidróxidos de hierro y aluminio (Omar *et al.*, 1989; Hernández *et al.*, 2002). También se han hallado poblaciones sobresalientes de esta rizobacteria en caña de azúcar (Pazos, 2000). *Bacillus* sp. a pesar de no ser de los géneros que dominan en la rizosfera de los cultivos de maíz, abunda en las plantaciones estudiadas. Resultados similares fueron encontrados en suelos típicos para el cultivo del maíz donde existen entre 15.58 y 15.60 % de bacterias pertenecientes a este grupo bacteriano (Hernández, 1996).

De los géneros estudiados, *Rhizobium* presentó los menores valores, resultados que coinciden con los encontrados en poblaciones muy pequeñas en la rizósfera del trigo (Hernández, 1998). Sin embargo, se ha informado como un género codominante en la rizosfera del maíz (Withmore, 2000). También se ha demostrado su presencia abundante en caña de azúcar (Sánchez, 1994).

Estudios realizados por Abe y Nakazawa (1993), El-Banna y Winkelman (1998), Kai *et al.* (2006), Quan *et al.* (2006) y Araque *et al.* (2007), han demostrado la actividad antifúngica de *Burkholderia cepacia* frente a hongos fitopatógenos. Esta propiedad ha determinado que los investigadores se interesen por esta bacteria como posible agente de control biológico, así como para inhibir el desarrollo de hongos patógenos humanos (Li *et al.*, 2008). En la presente investigación se demostró la actividad antagonista de *B. cepacia* contra los hongos fitopatógenos estudiados.

El mecanismo del antagonismo de *B. cepacia* frente a hongos ha sido objeto de estudio por diversos investigadores, quienes han sugerido tres mecanismos: 1) la producción de sideróforos 2) por producción de antibióticos y 3) competición por

otros nutrientes (Parke y Gurian, 2001; Coenye y Vandamme, 2003; O'Sullivan *et al.*, 2007; Mahenthiralingam *et al.*, 2008).

Los resultados obtenidos en este estudio evidencian que las cepas pertenecientes al complejo *B. cepacia*, aisladas de rizósfera de maíz (SB2, ER3, LG12, N10), así como la cepa ATCC 25416, inhibieron el crecimiento de *T. viride*, el cual es un importante fitopatógeno, a través de la producción de compuestos antifúngicos difusibles y no difusibles en el medio, observándose mayor actividad antifúngica por la producción de compuestos no difusibles ya que se obtuvieron diámetros promedio de halos de inhibición mayores cuando la cepas hacían contacto con el medio de cultivo, y además, probablemente la producción de sideróforos no esté implicada en el antagonismo de las cepas bacterianas ya que no se observó asociación entre la presencia de halos de inhibición y la pigmentación de las mismas.

Estos resultados son similares a los reportados por Jayaswal *et al.* (1990), quienes aislaron una cepa de *B. cepacia* (RJ3) productora de una sustancia inhibitoria difusible con actividad antifúngica frente a hongos fitopatógenos, la cual fue purificada por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) y caracterizada por radiación ultravioleta (UV), radiación infrarrojo (IR), resonancia magnética nuclear (NMR) y espectroscopia de masa, como pirrolnitrín. Igualmente, Kai *et al.* (2006) demostraron que la actividad antifúngica de una cepa de *B. cepacia* (1S18) frente al hongo fitopatógeno *Rhizoctonia solani*, se debía a la producción de pequeñas cantidades de una sustancia volátil no difusible en el medio por parte de la bacteria. Quan *et al.* (2006) aislaron y caracterizaron una nueva cepa de *B. cepacia* (CF-66) con una gran actividad inhibitoria sobre el hongo fitopatógeno *Rhizoctonia solani* por producción de compuestos antifúngicos.

*B. cepacia* ha sido considerada como un posible agente de control biológico en la industria agrícola (Parkinson *et al.*, 1971; Bell *et al.*, 1982; Kai *et al.*, 2006); debido

a que puede antagonizar y reprimir microorganismos fitopatógenos, así se le ha encontrado inhibiendo la germinación de esporas de *Alternaria* sp., y atacando al hongo *Aphanomyces euteiches*, el cual causa la podredumbre de raíces en guisantes y alfalfa (Aleman *et al.*, 2003).

Algunos autores han relacionado esta acción inhibitoria de la bacteria con la alteración en la síntesis de quitina de la pared celular del hongo, debido a que los hongos filamentosos contienen mayor cantidad de quitina en su pared que los levaduriformes, los cuales contienen mayor proporción de glucanos que de quitina, de acuerdo a esto, se puede inferir sobre qué componente de la pared celular del hongo está actuando la bacteria y cuál sería su mecanismo de acción para inhibir el crecimiento fúngico, esto explicaría la mayor acción inhibitoria de *B. cepacia* sobre los hongos filamentosos (Fassouane *et al.*, 1995).

Cuando se probó la actividad antagónica utilizando cultivos de *B. cepacia* frente a los hongos filamentosos: *Fusarium solani*, *Fusarium moniliforme*, *Aspergillus niger* y *Penicillium expansum* no se observó inhibición del crecimiento fúngico, sólo inhibió a *Trichoderma viride*. Posiblemente esto se deba a la composición y naturaleza de los metabolitos con propiedades antifúngicas, los cuales no son capaces de atravesar la membrana de nitrocelulosa quedando adherida a ella. (Cook and Baker, 1983; Fassouane *et al.*, 1995).

Por otra parte, las diferencias observadas entre los hongos filamentosos frente al mismo compuesto pueden indicar un mecanismo diferencial utilizado en la transformación de estos compuestos, debido a la existencia de diferencias metabólicas y bioquímicas entre estos hongos. Estos resultados podrían indicar que dichos compuestos actúan sobre sustancias químicas (enzimas) indispensables de *Trichoderma viride*, mientras que *Fusarium solani*, *Fusarium moniliforme*, *Aspergillus niger* y *Penicillium expansum* (i) carecen de estas enzimas, (ii) poseen

rutas alternativas que evitan el bloqueo enzimático o bien, (iii) transforman estas sustancias a otras formas que no le sean tóxicas (Lim *et al.*, 2001). Esta respuesta diferencial podría ser independiente de la estructura química de los extractos ensayados.

Las variaciones en los factores nutricionales y ambientales de la bacteria a menudo también resultan en la alteración de la producción de antibióticos. La alteración envuelve cambios tanto en la producción como en la composición del compuesto. Roitman *et al.* (1990), Upadhyay *et al.* (1991) y El Banna *et al.* (1998) reportaron cambios en la composición y producción de metabolitos secundarios (fenilpirrol) al variar las condiciones de crecimiento de *B. cepacia*. Los resultados obtenidos en este estudio coinciden con los reportados por estos autores, la producción del compuesto antifúngico se vio influenciada por la variación en los factores de crecimiento tanto en las cepas de *B. cepacia* aisladas de rizósfera de maíz (SB2, ER3, LG12, N10) como en la ATCC.

La actividad antifúngica máxima se obtuvo a una temperatura de 35 °C, la cual se encuentra dentro del rango de temperatura óptimo para el crecimiento de *Burkholderia cepacia* (Li *et al.*, 2008). Sin embargo, también se encontró actividad a bajas temperaturas (18 °C), indicando con esto que existe un amplio rango de temperatura (18-35 °C) para la producción de actividad antifúngica.

Se encontró que el pH inicial del medio de cultivo de *B. cepacia*, puede variar la producción de metabolitos activos del agente de biocontrol. En este estudio el pH inicial del medio de cultivo fue ajustado hasta 6, lo que pudo incrementar la producción de sustancias antifúngicas por la bacteria. Resultados similares fueron obtenidos por Roitman *et al.* (1990) y Hwang *et al.* (2002), quienes reportaron que a pH ácidos (5) las cepas de *B. cepacia* producen más pirrolnitrin en el medio. Por otra parte, Slininger y Shea-Wilbur (1995) demostraron que la mayor producción de

Fenacina por *P. fluorescens* se obtuvo a bajo pH. Jayaswal *et al.* (1990) encontraron que las fuentes de nitrógeno inorgánico aumentan la actividad antagónica de *B. cepacia*, posiblemente, debido a que el amonio produce un cambio de pH en medio. Esto pudiera explicar los resultados obtenidos en este estudio donde la actividad antifúngica de las cepas fue mayor a pH ácidos que alcalinos, lo cual es significativo para el uso de *B. cepacia* como agente de biocontrol, ya que los suelos con pH ácidos probablemente favorecerían la capacidad de *B. cepacia* de producir actividad antagónica, y los hongos son relativamente capaces de invadir medios ácidos, como es el caso de los hongos fitopatógenos y las levaduras que pueden desarrollarse a un pH de 5,0 a 5,5 (Casas, 1989).

La actividad antifúngica de *B. cepacia* frente a *T. viride* aumentó en presencia de xilosa y tetralosa como únicas fuentes de carbono. Igualmente, se observó alteración en la producción de pigmento por parte de la bacteria. Sin embargo, no hubo correlación entre la producción de pigmento y la actividad antagónica. La utilización de cistina, valina y leucina como única fuente de nitrógeno también aumentaron la actividad antifúngica de las cepas de *B. cepacia*.

*B. cepacia* es una bacteria nutricionalmente versátil debido a la capacidad de utilizar como fuente de carbono un gran número de carbohidratos así como diversos aminoácidos como fuente de nitrógeno (Li *et al.*, 2008). Los factores nutricionales tuvieron un gran impacto sobre la actividad antifúngica de *B. cepacia*, demostrándose, en el presente estudio, la capacidad de la bacteria de inhibir el crecimiento de hongos en presencia de una variedad de fuentes de carbono y nitrógeno. Convirtiéndose en una buena perspectiva en el campo de la biotecnología, para el control de enfermedades fúngicas en las plantas que tienen una importancia económica considerable.

Se probó la actividad antifúngica de los metabolitos obtenidos de los extractos de las cepas de *B. cepacia* aisladas de rizósfera de maíz y se encontró que los metabolitos inhiben el crecimiento de *T. viride*, demostrándose que la presencia de células vivas o el contacto celular no están envueltos en la inhibición del hongo, sugiriendo en parte que la actividad antimicrobiana se debe a la excreción de compuestos extracelulares.

La actividad antifúngica fue determinada en diferentes diluciones de los extractos de las cepas de *B. cepacia*, lográndose inhibición de *T. viride* en todas las diluciones de los extractos; sin embargo, el mayor porcentaje de inhibición del hongo se observó con los extractos más concentrados. Se encontró, en una investigación realizada por McLoughlin *et al.* (1992), que la concentración mínima inhibitoria de pirrolnitrin frente a *Sclerotinia sclerotium* es de 0,01 µg/ml. Al respecto, Chernin *et al.* (1996), reportaron que el antibiótico pirrolnitrin producido por *Enterobacter agglomerans* fue efectivo, a bajas concentraciones, contra *B. cinérea*, *R. solani* y *S. rolfsii*. Igualmente, Dikin *et al.* (2007) reportaron que una mezcla de sustancias antimicrobianas producidas por *B. multivorans* y *Microbacterium testaceum* fueron efectivas ante *Schizophyllum commune*, aún cuando el extracto crudo fue diluido por encima de 1:50. El porcentaje de inhibición obtenido para la especie *T. viride* evidencia la efectividad de los compuestos analizados antifúngicos. Este hecho indicaría un buen comportamiento de estos compuestos como agentes de control de hongos fitopatógenos.

De las mezclas de solventes probadas, para separar las fracciones con actividad del extracto crudo de *B. cepacia* mediante cromatografía en capa fina, la hexano-acetona fue la que mostró mejores resultados, sin embargo, al realizar las pruebas de actividad antifúngica a estas fracciones no se encontró actividad alguna frente a *T. viride*. Chernin *et al.* (1996) detectó por cromatografía en capa fina, cuatro fracciones con diferentes valores de Rf, de las cuales una mostró un Rf de 0,70

similar al valor obtenido por el estándar de pirrolnitrin utilizado por ellos. Dikin *et al.* (2007), encontraron cinco bandas o fracciones, por cromatografía de capa fina, con diferentes valores de Rf, obtenidas de compuestos con actividad antifúngica de cepas de *B. cepacia*. Algunos autores han reportado valores similares de Rf para pirrolnitrin (Arima *et al.*, 1968; Burkhead *et al.*, 1994) comparados con datos obtenidos en otros estudio (Homma *et al.*, 1989; McLoughlin *et al.*, 1992; Chernin *et al.*, 1996). Estas diferencias en cuanto a resultados obtenidos podría ser explicada por la variación en los absorbentes de silica gel y a las mezclas de solventes empleadas para el estudio.

La producción de compuestos antifúngicos ha sido considerada como uno de los mecanismos envueltos en el antagonismo de *B. cepacia* (El-Banna *et al.*, 1998). *Burkholderia cepacia* produce una gran cantidad de antibióticos, los cuales poseen actividad antimicrobiana, como Cepacidine A, Cepacidine B, Xylocandin y Pyrrolnitrin (Abe y Nakazawa, 1993; Li *et al.*, 2008). El espectro antimicrobiano de estos compuestos es distinto. Así, compuestos como Cepacin A y Cepacin B presentan actividad antibacteriana, en cambio Pyrrolnitrin es efectivo como antifúngico, tanto en hongos filamentosos como en levaduras, así como también tiene efecto inhibitorio sobre bacterias Gram positivas. Los lipopéptidos tienen una gran actividad inhibitoria sobre algunos hongos del suelo, especialmente *Pythium ultimum* y *Collectotrichium* sp., pero tiene poco efecto sobre *C. albicans*, otras levaduras y algunos hongos filamentosos. Cepacidin es un glucopéptido con una potente actividad antifúngica. Cepaciamide A y B son compuestos fungotóxicos que tienen actividad sobre *Botrytis cinérea* y *Penicillium expansum*. Sin embargo, estos compuestos no han sido muy utilizados en la agricultura debido a su limitado espectro antifúngico y estabilidad (Abe y Nakazawa, 1993; Lee *et al.*, 1994; El-Banna *et al.*, 1998).

## CONCLUSIONES

Este estudio demostró la actividad antifúngica *in vitro* de cepas de *B. cepacia* aisladas de maíz amarillo (*Zea mays* L.) de cuatro plantaciones del Municipio Montes, estado Sucre, sobre *T. viride*, aumentando la actividad antagónica cuando la bacteria crece en condiciones de pH ácido, a una temperatura de 35 °C y en presencia de xilosa y cistina como únicas fuentes de carbono y nitrógeno, respectivamente. Igualmente, la capacidad de inhibir la esporulación de otros hongos fitopatógenos del maíz como: *Fusarium solani*, *Fusarium moniliforme*, *Aspergillus niger*, y *Penicillium expansum*. Demostrando con esto que al trabajar con cepas nativas aumenta la factibilidad biológica del compuesto implicado en este antagonismo.

Así mismo, los extractos crudos obtenidos de las cepas inhibieron en un 80% el crecimiento del hongo, observándose inhibición aún a bajas concentraciones del mismo, demostrando que la célula viva o el contacto celular no están envueltos en la inhibición del hongo, sugiriendo que la actividad antagónica se debe, en parte, a la excreción de compuestos extracelulares con actividad antifúngica por parte de la bacteria.

La adaptabilidad a diferentes condiciones ambientales demostrada por la bacteria, podría satisfacer las necesidades para el control biológico de las enfermedades fúngicas en la agricultura bajo varias condiciones agrícolas.

## RECOMENDACIONES

Completar los estudios para la separación, mediante cromatografía y espectrometría de masas, de los componentes con actividad antifúngica en estas cepas ambientales y su concentración individual, con el fin de conocer cuales son los componentes que poseen una mayor actividad antifúngica.

Determinar el mecanismo implicado en la inhibición de los hongos por los compuestos, o las fracciones de estos, que presentaron actividad.

Se recomienda evaluar otros tipos de actividad *in vitro* para ampliar el rango de acción de los metabolitos obtenidos utilizando diferentes concentraciones del mismo, y así, posteriormente realizar pruebas *in vivo*.

## BIBLIOGRAFÍA

- Abe, M. y Nakazawa, T. 1993. Characterization of Hemolytic and Antifungal Substance, Cepalycin, from *Pseudomonas cepacia*. *Microbiol.Immunol.*, 38: 1-9.
- Adams, P. 1990. The potential of mycoparasites for biological control of plant diseases. *Annual Review of Phytopathology*, 28:59-72.
- Ait Barka, E.; Belarbi, A.; Hachet, C.; Nowak, J. y Audran, J. 2000. Enhancement of in vitro growth and resistance to gray mould of *Vitis vinifera* L. co cultured with plant growth-promoting rhizobacteria. *FEMS Microbiol lett.*, 186:91-95.
- Alemán, I.; Sánchez, J.; Sealey, M.; Rojas, J.; López, G. 2003. Empleo de una cepa de *Burkholderia cepacia* en el control de la mancha azul en la madera de pino caribe (*Pinus caribae*). *Ciencia*, 11:39-46.
- Anuratha, C. y Gnanamanickam, S. 1990. Biological control of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum* in India with antagonistic bacteria. *Plant Soil*, 124:109-116.
- Araque, Y.; Alvarado, L.; Centeno, S.; Rodríguez, V. y Vitelli, J. 2007. Actividad antibiótica y antifúngica de *B. cepacia* provenientes de ambientes nosocomiales. Servicio Autónomo Hospital universitario “Antonio Patricio Alcalá”. Cumaná, Venezuela. *Kasmera*, 35(2):107-117.
- Arima, K.; Kakinuma, A. y Tamura, G. 1968. Surfactin, a crystalline peptidelipid surfactant produced by *Bacillus subtilis*: Isolation, characterization and its inhibition of fibrin clot formation. *Biochem Biophys Res Commun.*, 31:488-494.
- Bacilio, M.; Aguilar, S.; Ventura, E.; Bouquelet, E. y Zenteno, E. 2003. Chemical characterization of root exudates from rice (*Oryza sativa*) and their effects on the chemotactic response of endophytic bacteria. *Plant Soil.*, 249: 271–277.
- Baker, R. 1987. Mycoparasitism: Ecology and physiology. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 9:370-379.

- Balandreau, J.; Viallard, V.; Cournoyer, B.; Coenye, T.; Laevens, S. y Vandamme, P. 2001. ***Burkholderia cepacia* genomovar III Is a common plant-associated bacterium.** *Applied and environmental microbiology*, 67(2):982-985.
- Baldwin, A.; Mahenthiralingham, E.; Drevinek, P.; Vandamme, P.; Govan, JR.; Waite, DJ.; Lipuma, J. y Chiarini, L. 2007. Environmental *Burkholderia cepacia* complex isolates in human infection. *Emerg Infect Dis.*, 13:458-461.
- Baldwin, A.; Mahenthiralingham, E.; Thickett, KM.; Honey-bourne, D.; Maiden, MC.; Govan, JR. *et al.* 2005. Multilocus sequence typing scheme that provides both species and strain differentiation for the *Burkholderia cepacia* complex. *J Clin Microbiol.*, 43: 4665-4673.
- Barnett, H. y Binder, F. 1973. The fungal host parasite relationship. *Ann.Rev.Phytopath.*, 11: 273-292
- Bell, D.; Wells, S. y Walksman, L. 1982. In vitro antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. *Phytopathology*. 72:379-383.
- Bernal, G.; Illanes, A. y Ciampi, L. 2002. Isolation and partial purification of a metabolite from a mutant strain of *Bacillus sp.* With antibiotic activity against plant pathogenic agents. *Electronic J. Biothechnol.*, 5:12-20.
- Bevivino, A.; Dalmastri, C.; Tabacchioni, S.; Chiarini, L.; Belli, M.; Piana, S., Materazzo, A.; Vandamme, P. y Manno, G. 2002. *Burkholderia cepacia* complex bacteria from clinical and environmental sources in Italy: Genomovar status and distribution of traits related to virulence and transmissibility. *J Clin Microbiol.*, 40:846-851.
- Blaaha, D.; Prigent-Combaret, C.; Mirza, M. y Moenne-Loccoz, Y. 2006. Phylogeny of the 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase-encoding gene *acdS* in phytobeneficial and pathogenic *Proteobacteria* and relation with strain biogeography. *FEMS Microbiol Ecol.*, 56:455-470.
- Brown, A. y Govan, J. 2007. Assessment of fluorescent *in situ* hybridization and PCR-based methods for rapid identification of *Burkholderia cepacia* complex organisms directly from sputum samples. *J Clin Microbiol.*, 45:1920-1926.

- Burkhead, KD.; Schisler, DA.; Slininger, PJ. 1994. Pirrolnitrin production by biocontrol agent *Pseudomonas cepacia* B37w in culture and in colonized wounds of potatoes. *Appl. Environ. Microbiol.*, 60:2031-2039.
- Burkholder W. 1950. Sour skin, a bacterial rot of onion bulbs. *Phytopathology.*; 64:468-475.
- Casas, RG. 1989. Micología General. Ediciones de la Biblioteca. Caracas. UCV.
- Chernin, L.; Brandis, A.; Ismailov, Z. y Chet, I. 1996. Pyrrolnitrin production by an *Enterobacter agglomerans* strain with a broad spectrum of antagonistic activity towards fungal and bacterial phytopatogens. *Curr. Microbiol.*, 32:208-212.
- Chet, I. 1987. Innovate approaches to plant control disease. En: *Trichoderma application, mode of action, and potential as a biocontrol agent of soilborne plant pathogenic fungi* Chet, I. (Ed). Willey series in Ecological and Applied Microbiology, New York: págs. 137-160.
- Coenye, T. y Vandamme, P. 2003. Diversity and significance of *Burkholderia* species occupying diverse ecological niches. *Environ Microbiol.*, 5:719-729.
- Coenye, T.; Mahenthalingam, E.; Henry, D.; Lipuma, J.; Laevens, S. *et al.* 2001. *Burkholderia ambifaria* sp. Nov., a novel member of the *Burkholderia cepacia* complex including biocontrol and cystic fibrosis-related isolates. *Int Syst Evol Microbiol.* 2001;51:1481-1490.
- Coenye, T.; Spilker, T.; Van Schoor, A.; Lipuma, JJ.; Vandamme. P. 2004. Recovery of *Burkholderia cenocepacia* strain PHDC from cystic fibrosis patients in Europe. *Thorax.*, 59:952-954.
- Coenye, T.; Vandamme, P.; Govan, JR.,; Lipuma, JJ. 2001. Taxonomy and Identification of the *Burkholderia cepacia* complex. *J Clin Microbiol.*, 39:3427-3436.
- Compant S.; Duffy, B.; Nowak, J.; Clement, C. y Ait Barka, E. 2005. Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action and future prospects. *Appl Environ Microbiol.*, 71:4951-4959.
- Cook, J. y Baker, J. 1983. The nature and practice of biological control of plant pathogens. St. Paul, Minnesota. APS Press.

- Copping, L.; Menn, J. 2000. Biopesticides: a review of their action, applications and efficacy. *Pest manag Sci*, 56: 651-767.
- Cunha, M.V.; Pinto-De-oliveira, A.; Meirinhos-Soares, L.; Salgado, M.J.; Melo-Cristino, J.; Correia, S.; Barreto, C. y Sa-correia, I. 2007. Exceptionally high representation of *Burkholderia cepacia* among *B. cepacia* complex isolates recovered from the major Portuguese cystic fibrosis center. *J Clin Microbiol.*, **45**: 1628–1633
- Cupples, D.; Sen, J. 1978. Isolation and characterization of a bacteriocin produced by *Pseudomonas solanacearum*. *J Gen Microbiol.*, 109:293-303.
- Dalmastri, C.; Baldwin, A.; Tabacchioni, S.; Bevivino, A.; Mahenthiralingam, E.; Chariani, L. *et al.* 2007. Investigating *Burkholderia cepacia* complex populations recovered from Italian maize rhizosphere by multilocus sequence typing. *Environ Microbiol.*, 9:1632-1639.
- DiCello, F.; Bevivino, A.; Chianni, L; Fani, R.; Paffetti, D.; Tabacchioni, S. y Dalmastri, C. 1997. Biodiversity of *Burkholderia cepacia* population isolated from the Maize Rhizosphere at different plant growth stages. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:4485-4493.
- Dikin, A.; Sijam, K.; Kadir, J. e Idris A. 2007. Mode of Action of Antimicrobial Substances from *Burkholderia multivorans* and *Microbacterium testaceum* Against *Schizophyllum commune* Fr. *Int. J. Agri. Biol.*, 9(2): 311-314.
- Elad, Y.; Chet, I.; Boyle, P. y Henis, Y. 1983. Parasitism of *Trichoderma* spp. On *Rhizoctonia solani* and *Sclerotium rolfsii*. Scanning electron microscopy and fluorescens microscopy. *Pytopathology*, 73:85-88.
- El-Banna, N. y Winkelmann, G. 1998. Pyrrolnitrin from *Burkholderia cepacia*: antibiotic activity against fungi and novel activities against Streptomycetes. *J Appl Microbiol.*, 85:69-78.
- Estrada, P.; Bustillos, R., y Caballero, J. 2001. *Burkholderia* a genus rich in plant-associated nitrogen fixers with wide environmental and geographic distribution. *Appl Environ Microbiol.*, 67:2790-2798.

- FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación). Plagas de las hortalizas. Manual de manejo integrado. Santiago de Chile; 1990. 550 pp.
- Fassouane A, Rachidi M, Rouffaud M, El-Abbouyi A, Nguyen V. 1995. In vitro antifungal activity of *Bacillus licheniformis* FSJ-2 products against dermatophytes. *J. Mycol. Méd.*, 5: 244-248.
- Fiore, A.; Laevens, S.; Bevivino, A.; Dalmastri, C.; Tabacchioni, S.; Vandamme, P. y Chiarini, L. 2001. *Burkholderia cepacia* complex: distribution of genomovars among isolates from the maize rhizosphere in Italy. *Environ. Microbiol.*, 3:137-143.
- Frommel, M.; Nowak, J. y Lazarovits, G. 1991. Growth enhancement and developmental modifications *in vitro* growth potato (*Solanum tuberosum* spp. *tuberosum*) as affected by a non-fluorescent *Pseudomonas* sp. *Plant Physiol.*, 96:928-936.
- Geftic, S.; Heymann, H. y Adair, F. 1979. Fourteen year survival of *Pseudomonas cepacia* in salts solution preserved with benzalkonium chloride. *Appl Environ Microbiol.*, 37:505-510.
- George S. 1963. Introducción a la Micología Industrial. Editorial Acribia. España.
- Gilligan, P. 1991. Microbiology of airway disease in patients with cystic fibrosis. *Clin Microbiol Rev.*, 4:35-51.
- Glick, B.; Cheng, Z.; Czarny, J. y Duan, J. 2007. Promotion of plant growth by ACC deaminasa-producing soil bacteria. *Eur J Plant Pathol.*, 119:329-339.
- Govan, J. y Deretic, V. 1996. Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*. *Microbiol Rev.*, 60:539-574.
- Govan, J. y Vandamme, P. 1998. Agricultural and medical microbiology: a time for bridging gaps. *Microbiology*, 144: 2373-2375.
- Govan, J.; Balandreau, J. y Vandamme, P. 2000. *Burkholderia cepacia*-friend and foe. *Asm News.*, 66:124-125.

- Govan, J.; Brown, A. y Jones, A. 2007. Evolving epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* and the *Burkholderia cepacia* complex in cystic fibrosis lung infection. *Future Microbiol.*, 2:153-164.
- Govan, J.; Brown, A.; Maddinson, J.; Doherty, C.; Nelson, J.; Dodd, M.; Greening, A. y Webb, A. 1993. Evidence for transmission of *Pseudomonas cepacia* by social contact in cystic fibrosis. *Lancet*, 342: 15-19.
- Govan, J.; Hughes, J. y Vandamme, P. 1996. *Burkholderia cepacia*: medical, taxonomic and ecological issues. *J med Microbiol.*, 45:395-407.
- Gray, E. y Smith, D. 2005. Intracellular and extracellular PGPR: commonalities and distinction in the plant-bacterium signaling processes. *Soil Biol Biochem.*, 37:395-412.
- Gregory, W.; McNabb, P. 1986. *Pseudomonas cepacia*. *Infection Control*, 7:281-284.
- Hallmann, J. 2001. Plant interactions with endophytic bacteria. En: *Biotic Interactions in Plant-Pathogen Associations*. Jeger, M. y Spence, N. (eds). Publicidades CABI. págs. 87-120.
- Hallmann, J.; Quadt-Hallmann, A., Mahafee, W. y Klopper, J. 1997. Bacterial endophytes in agricultural crops. *Can J Microbiol.*, 43:895-914.
- Henry, D.; Mahenthalingam, E.; Vandamme, P.; Coenye, T. y Speert, D. 2001. Phenotypic methods for determining genomovar status of the *Burkholderia cepacia* complex. *J Clin Microbiol.*, 39:1073-1078.
- Hernández, A. 1996. Características de géneros asociados a los cultivos de gerbera y clavel. *Cultivos Tropicales*, 21(3): 15-18.
- Hernández, A.; Fernández, A.; Pérez, J.; Miranda, S.; Fons, C.; Hernández, A.N. y Santander, J. L. 1998. Producción, purificación y diagnóstico de sideróforos a partir de la cepa de *Pseudomonas fluorescens* J-1443. *Cultivos Tropicales*, 20(1):21-25.
- Hernández, A.; Rives, N.; Caballero, A.; Hernández, A.N. y Heydrich, M. 2002. Caracterización de rizobacterias asociados al cultivo del maíz en la producción de metabolitos del tipo AIA, sideróforos y ácido salicílico. *Rev. Col. Biotec.*, 6(1): 6-13.

- Holmes A.; Govan, J. y Goldstein R. 1998. The agricultural use of *Burkholderia (Pseudomonas) cepacia*: a threat to human health?. *Emerg infec Dis.*, 4: 221-227.
- Homma, Y.; Sato, Z.; Hirayama, F.; Konno, K.; Hirayama, H. y Zusui, T. 1989. Productions of antibiotics by *Pseudomonas cepacia* as an agent for biological control of soilborne plant pathogens. *Soil Biol. Biochem.*, 21:723-728.
- Howell, C. ; Stipanovic, D. ; Lumsden, D. 1993. Antibiotic production by strains of *Gliocladium virens* and its relation to the biocontrol of cotton seedling disease. *Biocontrol Science Technology*, 3 :435-441.
- Howell, C.R. y Stipanovic, R.D. 1995. Mechanisms in the biocontrol of *Rhizoctonia solani*-induced cotton seedling diseases by *Gliocladium virens*: Antibiosis. *Phytopathology*, 85: 469-472.
- Hu, F. y Young, J. 1998. Biocidal activity in plant pathogenic *Acidovorax*, *Burkholderia*, *Herbaspirillum*, *Raldstonia* and *Xanthomonas* spp. *J Appl Microbiol.*, 84:263-271.
- Hwang, J. ; Chilton, W. y Benson, D. 2002. Pyrrolnitrin production by *Burkholderia cepacia* and biocontrol of *Rhizoctonia* stem rot of poinsettia. *Biol Contr.* , 25 :56-63.
- Isles, A.; Maclusky, I.; Corey, M.; Gold, R.; Prober, C.; Fleming, P. y Levinson, H. 1984. *Pseudomonas cepacia* infection in cystic fibrosis: an emerging problem. *J pediatr.*, 104:206-210.
- Jayaswal, R.; Fernández, M.; Sobroeder, R. 1990. Isolation and characterization of a *Pseudomonas* strain that restricts growth of various phytopathogenic fungi. *Appl Environ Microbiol.*, 56:1053-1058.
- Jayaswal, R.; Fernández, M.; Visintin, L. y Upadhyay, R. 1993. Transposon Tn259 mutagenesis of *Pseudomonas cepacia* to isolate mutants deficient on antifungal activity. *Can.J.Microbiol.* 38:309-312.
- Jiao, Y.; Yoshihara, T.; Ishikuri, S.; Uchino, H.; Ichihara, A. 1996. Structural identification of Cepaciamide A, a novel fungitoxic compound from *Pseudomonas cepacia* D-202. *Tetrahedron Lett.*, 37:1039-1040.

- Jiménez, M. 1998. Estudio de la interacción planta de arroz-rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal. *Rev. Col. Biotec.*, 3(1): 5-10.
- Kai, M.; Effmert, U.; Berg, G. y Piechulla B. 2006. Volatiles of bacterial antagonist inhibit mycelial growth of the plant pathogen *Rhizoctonia solani*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 55:1053-1057.
- Kang, Y.; Carlson, R.; Tharpe, W. y Shell, M. 1998. Characterization of genes involved in biosynthesis of a novel antibiotic from *Burkholderia cepacia* BC11 and their role in biological control of *Rhizoctonia solani*. *Appl Environ Microbiol.*, 64:3939-3947.
- Lee, C.; Kim, S.; Hyum, B.; Suh, J.; Yon, C.; Lim, Y., Kim, C. 1994. Cepacidine A, a novel antifungal antibiotic produced by *Pseudomonas cepacia* I. Taxonomy, production, isolation and biological activity. *Antibiot.*, 47:1402-1438.
- Li, X.; Quan, CS.; Yu, HY.; Fan, SD. 2008. Multiple effects of a novel compound from *Burkholderia cepacia* against *Candida albicans*. *FEMS Microbiol Lett.*, 85:250-256.
- Lim, D., Hains, P., Walsh, B., Bergquist, P. y Nevalainen, H. 2001. Proteins associated with the the cell envelope of *Trichoderma reesei*: A proteomic approach. *Proteomics*, 1: 899-910.
- Lipuma, J.; Dasen, S.; Nielson, W.; Stern, R. y Stull, T. 1990. Person to Person transmission of *Pseudomonas cepacia* between patients with cystic fibrosis. *Lancet*, 336:1094-1096.
- Lipuma, J.; Spilker, T.; Coenye, T. y González, C. 2002. An epidemic *Burkholderia cepacia* complex strain identified in soil. *Lancet*, 359:2002-2003.
- Lodewyckx, C.; Vangronsveld, J.; Porteous, F.; Moore, E.; Taghavi, S.; Mezgeay, M. y Van der Lelie, D. 2002. Endophytic bacteria and their potential applications. *Crit Rev Plant Sci.*, 21:583-606.
- López, R. y López, M. 1990. El diagnóstico de suelos y plantas. Métodos de campo y laboratorio. Ed. Mundi-Prensa 4ª Ed. Madrid. 363 pp.

- Mahenthiralingam, E.; Baldwin, A.; Dowson, CG. 2008. *Burkholderia cepacia* complex bacteria: opportunistic pathogens with important natural biology. *J Appl Microbiol.*, 104:1539-1551.
- Mahenthiralingam, E.; Bischof, J.; Byrne, S.; Radomski, C.; Davies, J.; Av-Gay, Y. y Vandamme, P. 2000. DNA-based diagnostic approaches for identification of *Burkholderia cepacia* complex, *Burkholderia vietnamiensis*, *Burkholderia multivorans*, *Burkholderia stabilis* y *Burkholderia cepacia* genomovars I and III. *J Clin Microbiol.*, 38:3165-3173.
- Mahenthiralingam, E.; Urban, TA.; Goldberg, JB. 2005. The multifarious, multireplicon *Burkholderia cepacia* complex. *Mat Rev Microbiol.*,3:144-156.
- Manning, W.; Vandaro, P. y Cox, E. 1973. Root and stem rot of geranium cuttings caused by *Rhizoctonia* and *Fusarium*. *Plant Dis*, 57:177-178.
- McLoughlin, T., Quinn, J., Bettermann, A. y Bookland, R. 1992. *Pseudomonas cepacia* suppression of sunflower wilt fungus and role of antifungal compounds in controlling the disease. *Appl. Environ. Microbiol.*, 58:1760-1763.
- McMenamin, JD.; Zaccane, TM.; Coenye, T.; Vandamme, P.; LiPuma JJ. 2000. Misidentification of *Burkholderia. cepacia* in US cystic fibrosis treatment centers: an analysis of 1051 recent sputum isolates. *Chest.*, 117(6):1661-1665.
- McSpadden G.; Mavrodi, L. Thomashow, L. y Weller, D. 2001. A rapid polymerase chain reaction-based assay characterizing rhizosphere populations of 2,4-DAPG-producing bacteria. *Phytopathology.*, 91:44-54.
- Melgarejo, P.; De Cal, A. y Sagasta, M. 1989. Influence of *Penicillium frequentans* and two of its antibiotics on production of stromata by *Monilinia laxa* in culture. *Can J Bot.*, 67:83-87.
- Miller, J. 1972. Experiments in molecular genetic. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, Nueva York.
- Miller, S.; LiPuma, J. y Parke, J. 2002. Culture-based and non-growth-dependent detection of the *Burkholderia cepacia* complex in soil environments. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:3750-3758.

- Mitidieri, L. 1988. Control Biológico de Hongos del Suelo con *Trichoderma*. *IDIA.*, 44:45-49.
- Mondino, P. y Vero, S. 1999. Control Biológico Postcosecha. Medidas para conservar frutas y hortalizas. *Horticultura Internacional*, 26:29 - 36.
- Nowak, J., y Shulaev, V. 2003. Priming for transplant stress resistance in *in vitro* propagation. *In vitro Cell Dev Biol-Plant.*, 39:107-124.
- O'Sullivan, LA.; Weightman, AJ.; Jones, TH.; Marchbank, AM.; Tiedje, JM.; Mahenthalingam, E. 2007. Identifying the genetic basis of ecologically and biotechnologically useful functions of the bacterium *Burkholderia vietnamiensis*. *Environ Microbiol.*, 9:1017-1034.
- Omar, J.; Sullivan, N. y Mashi, T. 1989. Using the spermosphere model technique to describe the dominant nitrogen-fixing microflora associated with wetland rice in two Egyptian soils. *Biol Fertil soils.*, 1:158-163.
- Pandey, P.; Kang, S. y Maheshwari, D. 2005. Isolation of endophytic plant growth promoting *Burkholderia* sp. MSSP from root nodules of *Mimosa pudica*. *Curr Sci.*, 89:177-180.
- Parke, JL.; Guirian-Sherman, D. 2001. Diversity of the *Burkholderia cepacia* complex and implications for risk assessment of biological control strains. *Annu Rev Phytopathol.*, 39:225-258.
- Parker, WL.; Rathnum, ML.; Seiner, V.; Trejo, WH.; Principe, PA.; Sykes, RB. 1984. Cepacin A and Cepacin B, two new antibiotics produced by *Pseudomonas cepacia*. *J antibiot.*, 37:431-440.
- Parkinson, D.; Gray, T.; Williams, S . 1971. Methods for studying the ecology of soil micro-organisms. IBP Handbook No. 19. Blackwell, Oxford, Inglaterra . 675 pp
- Payne, GW.; Vandamme, P.; Morgan, SH.; Lipuma, JJ.; Coenye, T.; Weightman, AJ., *et al.* 2005. Development of a rec A gen-based identification approach for the entire *Burkholderia* genus. *Appl Environ Microbiol.*, 71-3917-3927.
- Pazos, M. y Annia, H. 2000. Aislamiento e identificación de cepas nativas pertenecientes al género *Azospirillum* mediante técnicas moleculares. En programas y

resúmenes XII seminario científico. Instituto nacional de Ciencia Agrícola. La Habana. Cuba.

Perin, L.; Martínez-Aguilar, L.; Paredes-Valdez, G.; Baldani, J.; Estrada-de Los Santos, P.; Reis, V. y Caballero-Mellado, J. 2006. *Burkholderia silvatlantica* sp. nov., a diazotrophic bacterium associated with sugar cane and maize. *Int J Syst Evol Microbiol.*, 56: 1931-1937.

Perry, B. 2001. Cosmetic microbiology. *Microbiol Today.*, 28:185-187.

Plesa, M.; Kholti, A.; Vermis, K.; Vandamme, P.; Panagea, S.; Winstanley, C. y Cornelis, P. 2004. Conservation of the *opcL* gene encoding the peptidoglycan-associated outer-membrane lipoprotein among representatives of the *Burkholderia cepacia* complex. *J Med Microbiol.*, 53:389-398.

Quan, C.; Zheng, W.; Liu, Q.; Ohta, Y.; y Fan, S. 2006. Isolation and characterization of a novel *Burkholderia cepacia* with strong antifungal activity against *Rhizoctonia solani*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 72:1276-1284.

Quan, CS.; Zheng, W.; Cao, ZM.; Wang, JH.; Fan, SD. 2005. Purification and properties of antibiotic from *Burkholderia cepacia* CF-66. *Acta Microbiol.*, 45:707-710.

Ramette, A.; Lipuma, J. y Tiedje, J. 2005. Species abundance and diversity of *Burkholderia cepacia* complex in the environment. *Appl Environ Microbiol.*, 71: 1193-1201.

Reik, R.; Spilker, T. y Lipuma, J. 2005. Distribution of *Burkholderia cepacia* complex species among isolates recovered from persons with or without cystic fibrosis. *J Clin Microbiol.*, 43: 2926-2928.

Roitman, J.; Mahoney, N.; Janisiewicz, W. 1990. Production and composition of phenylpyrrole metabolites produced by *Pseudomonas cepacia*. *Appl Microbiol Biotechnol.*, 34:381-386.

Saddler, G. 1994. "IMI descriptions of fungi and bacteria No. 1218. *Burkholderia gladioli* pv. *gladioli*". *Mycopathologia.*, 128: 57-58

- Saiman, L. y Siegel, J. 2004. Infection control in cystic fibrosis. *Clin Microbiol Rev.*, **17**: 57–71.
- Sanchez, J. 1994. Influencia de bacteria y acidos húmicos en trigo (*Triticum aestivum* L.) bajo riesgo. Anuario del IICB. UMSNH. México.
- Sangodkar, U.; Chapman, P. y Chakrabarty, A. 1988. Cloning, physical mapping and expression of chromosomal genes specifying degradation of the herbicide 2,4,5-T by *Pseudomonas cepacia* AC1100. *Gene*, 71:267-277.
- Schimel, J. 1995. Ecosystem consequences of microbial diversity and community structure. En: *Arctic and Alpine Biodiversity: patterns, causes, and ecosystem consequences*. F.S. Chapin and C. Korner (Eds.). Springer-Verlag, Berlin. págs. 239-254.
- Sivamani, E. y Gnanamanickam, S. 1988. Biological control of *Fusarium oxysporum* sp. *cubense* in banana by inoculation with *Pseudomonas fluorescens*. *Plant and Soil.*, 107: 3-9.
- Slininger, P. y Shea-Wilbur, M. 1995. Liquid culture pH, temperature, carbon not nitrogen source regulate phenazine productivity of the take-all biocontrol agent *Pseudomonas fluorescens*. *Appl Microbio Biotechnol.*, 37:388-392.
- Smith, D. y White, D. 1993. Diseases of corn. *Amer Soc Microbiol.*, 38: 1-9.
- Soriano, J. 2007. Micotoxinas en alimentos. Ediciones Diaz de Santos. Madrid, España.
- Speert, D.P. 2000. Identification and population structure of *Burkholderia stabilis* sp. nov. (formerly *Burkholderia cepacia* genomovar IV). *J Clin Microbiol.*, **38**: 1042–1047.
- Sturtz, A.V.; Christie, B.R. y Nowak, J. 2000. Bacterial endophytes: potential role in developing sustainable systems of crop production. *Plant Sci.*, 19:1-30.
- Tablan, O.C.; Chorba, T.L.; Schidlow, D.V.; White, J.W.; Hardy, K.A.; Gilligan, P.H.; Morgan, W.M. y Carson, L.A. 1985. *Pseudomonas cepacia* colonization in patients with cystic fibrosis: risk factors and clinical outcome. *J Pediatr.*, **107**, 382–387.

- Upadhyay, R.; Visintin, L.; Jayaswal, R. 1991. Environmental factors affecting the antagonism of *Pseudomonas cepacia* against *Trichoderma viridae*. *Can.J.Microbiol.*, **37**:880-884.
- Vandamme, P.; Henry, D.; Coenye, T.; Nzula, S.; Vancanneyt, M.; Lipuma, J.J.; Speert, D.P. y Govan, J.R. 2002. *Burkholderia anthina* sp. nov. and *Burkholderia pyrrocinia*, two additional *Burkholderia cepacia* complex bacteria, may confound results of new molecular diagnostic tools. *FEMS Immunol Med Microbiol.*, **33**: 143–149.
- Vandamme, P.; Holmes, B.; Coenye, T.; Goris, J.; Mahenthiralingam, E.; Lipuma, J.J. y Govan, J.R. 2003. *Burkholderia cenocepacia* sp. nov.– a new twist to an old story. *Res Microbiol.*, **154**: 91–96.
- Vandamme, P.; Holmes, B.; Vancanneyt, M.; Coenye, T.; Hoste, B.; Coopman, R.; Revets, H. y Lauwers, S. 1997. Occurrence of multiple genomovars of *Burkholderia cepacia* in cystic fibrosis patients and proposal of *Burkholderia multivorans* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol.*, **47**: 1188–1200.
- Vandamme, P.; Mahenthiralingam, E.; Holmes, B.; Coenye, T.; Hoste, B.; De Vos, P.; Henry, D. y Speert, D. 2000. Identification and population structure of *Burkholderia stabilis* sp. nov. (formerly *Burkholderia cepacia* genomovar IV). *J Clin Microbiol.*, **38**, 1042–1047.
- Vermis, K.; Coenye, T.; Mahenthiralingam, E.; Nelis, H.J. y Vandamme, P. 2002. Evaluation of species-specific *recA*-based PCR tests for genomovar level identification within the *Burkholderia cepacia* complex. *J Med Microbiol.*, **51**: 937–940
- Vessey, K. 2003. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant soil.*, **255**:571-586.
- Wakayama, S.; Ishikawa, F.; Eishi, K. 1984. Mycocerein, a novel antifungal peptide antibiotic produced by *Bacillus cereus*. *Antimicrobl Agents Chemother.*, **26**:936-940.
- Wang, K.; Knill, E.; Glick, B. y Défago, G. 2000. Effect of transferring 1-aminocyclopropano-1-carboxylic acid (ACC) deaminase genes into *Pseudomonas*

*fluorescens* strain CHA0 and its *gacA* derivate CHA96 on their grown-promoting and disease-suppressive capacities. *Can J Microbiol.*, 46:898-907.

Whipps, JM. 1987. Effect of media of growth and interactions between a range of soil-borne glass-house pathogens and antagonistic fungi. *New Phytol.*, 107: 127-142.

Winkelstein, J. A.; Mariko, M. C.; Johnston, R. B.; Boyle, J.; Curnutte, J.; Gallin, J. I.; Malech, H. L.; Holland, S. M. y Ochs, H. 2000. Chronic granulomatous disease. Report on a national registry of 368 patients. *Medicine*, 79: 155–169.

Withmore, A. 2000. The biological management of soil fertility project. *Neth J Agric Sci.*, 48:115-122.

Yu, FY.; Li, ZH.; Zeng, HC. 2005. Proffress on the research in antifungal agricultural antibiotics. *Chin J Tropical Agric.*, 25:60-65,

Zar J. Biostatistical Analysis. Second Edition. Prentice Hall, New Jersey, 717 pp.

## HOJA DE METADATOS

### Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 1/5

<b>Título</b>	Actividad Antifúngica de <i>Burkholderia cepacia</i> ( <i>Zea mays</i> . L) bajo diferentes condiciones de cultivo.
<b>Subtítulo</b>	

**Autor(es)**

<b>Apellidos y Nombres</b>	<b>Código CVLAC / e-mail</b>	
<b>Parra G., Evis Y.</b>	<b>CVLAC</b>	<b>10947421</b>
	<b>e-mail</b>	<a href="mailto:eviespin@hotmail.com">eviespin@hotmail.com</a>
	<b>e-mail</b>	
	CVLAC	
	e-mail	
	e-mail	
	CVLAC	
	e-mail	
	e-mail	
	CVLAC	
	e-mail	
	e-mail	

Palabras o frases claves:

Antagonismos
<i>Burkholderia cepacia</i>
Fitopatogenos

## Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 2/5

Líneas y sublíneas de investigación:

Área	Subárea
CIENCIAS	BIOLOGÍA APLICADA
	Microbiología

Resumen (abstract):

Se evaluó la actividad antifúngica *in vitro* de 4 cepas de *Burkholderia cepacia* aisladas de rizósfera de maíz amarillo (*Zea mays* L.) de diferentes plantaciones del Municipio Montes, estado Sucre, Venezuela, contra hongos fitopatógenos. Se comparó la actividad antagónica con una cepa control de origen ambiental CVCM 626 (ATCC 25416) y un aislado clínico CVCM 1282. La actividad antifúngica se evaluó empleando el método directo de enfrentamientos duales y un método indirecto de difusión con discos de agar. Igualmente se extrajo el metabolito activo y se realizó cromatografía en Sílica Gel, utilizando la mezcla hexano-acetona (3:1) como fase móvil, para tratar de aislar el compuesto. Las pruebas se elaboraron por triplicado, se midió el diámetro de los halos de inhibición formados y se aplicó análisis de varianza de una vía (ANOVA) con un nivel de confianza del 95% y la prueba Tukey. Las cuatro cepas aisladas (SR2, ER3, LG12 y N10) mostraron una actividad antifúngica similar sobre *Trichoderma viride*, y ocasionaron una inhibición total o parcial de la esporulación en hongos como *Fusarium moniliforme*, *Fusarium solani*, *Aspergillus niger* y *Penicillium expansum*. Los mayores halos de inhibición fueron producidos por la cepa CVCM 626, observándose un promedio de 9,9 mm. No se evidenció ningún nivel de antagonismo utilizando el aislado clínico. Se mostró aumento de la actividad antagónica frente a *T. viride* con algunas fuentes de carbono como xilosa, maltosa, manosa y fructosa, en un rango de pH ácido (4 a 5.5), y a una temperatura de 35°C. El efecto antifúngico de las cepas aisladas sugiere la presencia de posibles metabolitos volátiles y difusibles, aunque no se demostró actividad antifúngica de los extractos etanólicos y de las fracciones de acetato de etilo obtenidos de las cepas bacterianas estudiadas. Además, se demostró la versatilidad de esta bacteria para producir actividad antifúngica en una variedad de fuentes de carbono, nitrógeno, pH y temperatura, como un potencial promisorio para el control biológico de hongos fitopatógenos.

# Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 3/5

Contribuidores:

Apellidos y Nombres	ROL / Código CVLAC / e-mail	
Centeno Briceño, Sara	ROL	CA <input checked="" type="checkbox"/> AS <input type="checkbox"/> TU <input type="checkbox"/> JU <input type="checkbox"/>
	CVLAC	6.150.351
	e-mail	sarafigue@gmail.com
	e-mail	
Araque Calderón, Yasmina	ROL	CA <input type="checkbox"/> AS <input type="checkbox"/> TU <input type="checkbox"/> JU <input checked="" type="checkbox"/>
	CVLAC	5.991.554
	e-mail	Yamasi40@gmail.com
	e-mail	
Dorta, Blas	ROL	CA <input type="checkbox"/> AS <input type="checkbox"/> TU <input type="checkbox"/> JU <input checked="" type="checkbox"/>
	CVLAC	6.160.230
	e-mail	bdorta@cantv.net
	e-mail	
	ROL	CA <input type="checkbox"/> AS <input type="checkbox"/> TU <input type="checkbox"/> JU <input type="checkbox"/>
	CVLAC	
	e-mail	
	e-mail	

Fecha de discusión y aprobación:

Año	Mes	Día
2009	05	07

Lenguaje: spa \_\_\_\_\_

## Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 4/5

Archivo(s):

Nombre de archivo	Tipo MIME
PG-EvisParra.doc	Application/Word

Alcance:

Espacial : \_\_\_\_\_ (Opcional)

Temporal: \_\_\_\_\_ (Opcional)

Título o Grado asociado con el trabajo:

MAGISTER SCIENTIARUM

Nivel Asociado con el Trabajo: Magister \_\_\_\_\_

Área de Estudio:

BIOLOGÍA APLICADA MENCIÓN MICROBIOLOGÍA

Institución(es) que garantiza(n) el Título o grado:

UNIVERSIDAD DE ORIENTE

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso –  
5/5

**Derechos:**

**Yo Evis Ynelda Parra González autorizo a la Universidad de Oriente a la publicación del resumen del trabajo de grado titulado ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE Burkholderia cepacia AISLADA DE MAIZ AMARILLO (*Zea Mays. L*) bajo diferentes condiciones de cultivo.**

---

---

---

---

---

---

---

---

**Parra G., Evis Y.  
AUTOR**

**Dra. Sara Centeno  
TUTOR**

**Dra. Yasmina Araque  
JURADO 1**

**Dr. Blas Dorta  
JURADO 2**

  
**POR LA SUBCOMISIÓN DE TESIS:**



